

Nachweis von Nukleinsäure-Wechselwirkungen mit Hilfe optischer Biosensoren

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Dirk Kuhlmeier
aus Wolfsburg

1. Referentin : Frau PD Dr. Ursula Bilitewski

2. Referent : Herr Prof. Dr. Klaus Buchholz

eingereicht am : 21. Oktober 1999

mündliche Prüfung (Disputation) am : 01. Februar 2000

Druckjahr : 2000

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Kuhlmeier D. & Bilitewski U. : Real-Time detection of DNA-hybridization using an optical biosensor (Poster), German-Russian Summer School for Analytical Biotechnology, Luckenwalde (1996).

Kuhlmeier D., Bilitewski U., Rodda E., Kolarik L.O., Furlong D.N. : Investigations with respect to optical DNA-sensors using AFM (Vortrag), Biosensors`98 World Congress, Berlin (1998).

Kuhlmeier D. & Bilitewski U. : Nukleinsäureanalytik mit optischen Detektoren (Vortrag), 1. Deutsches Biosensor-Symposium, München (1999).

Patente

Kuhlmeier D. & Bilitewski U. : Detecting DNA mutation by amplifying using polymerase chain reaction, WO 9853098, 26.11.98.

Wenn man genau weiß,
was man machen wird,
wozu soll man es
machen.

Pablo Picasso

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ursula Bilitewski für die Betreuung meiner Arbeit, für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und für die Freiheit, die Sie mir (trotzdem !) bei meiner wissenschaftlichen Arbeit ließ.

Herrn Prof. Klaus Buchholz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank geht an meine Freunde und Kollegen in der Projektgruppe Biosensoren, die ein positives Arbeitsumfeld schufen und mir halfen, auch frustrierende Tage (die es ja auch während einer Doktorarbeit geben soll...) zu überstehen.

Herrn Adrian Klein danke ich für viele vernünftige und weniger vernünftige Diskussionen und seine ständige Bereitschaft, mich in allen Lebenslagen zu unterstützen.

Frau Tanja Richter einen lieben Dank sowie auch an Frau Birgit von Tiedemann, die mich beide durch die Höhen und Tiefen des Studiums und der Forschung begleiteten.

Frau Dr. Ingrid Rohm, Herrn Dr. Matthias Stiene und Herrn Alexander Günther danke ich für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. D. Neil Furlong, Herrn Dr. Luis O. Kolarik, Frau Elke Rodda, Frau Karen Grieve, Herrn Dr. Elliot und vielen anderen am CSIRO for Molecular Science in Melbourne/Australien möchte ich für Ihre tatkräftige (und z. T. väterliche) Unterstützung danken, die meinen Aufenthalt an Ihrem Institut unvergeßlich gemacht haben.

Herrn Dr. Joop van den Heuvel, Frau Katja Eckert und Frau Ute Widow (Bereich BVT, GBF) möchte ich für die fleißige Hilfe und Unterstützung bei der Arbeit mit der RNA danken.

Frau Dr. Christiane Honisch (TU Braunschweig) danke für viele Hilfestellungen in molekularbiologischen Fragen.

Herrn PD Dr. Mahavir Singh (TU Braunschweig) danke ich für die Möglichkeit, in seinen Laboren arbeiten zu dürfen.

Meinen Dank an die Mannschaft der Zellkulturtechnik, die nicht nur Ihren Drucker und Ihr selbstgebrautes Bier zur Verfügung stellten, sondern mit denen so gute Wetten möglich waren, daß sich schon mal die Haarfarbe ändern konnte.

Meinen Eltern danke ich für Ihr Vertrauen, Ihre ständige Ermutigung und Unterstützung.

Ein großer und lieber Dank, nicht nur für die kritische Durchsicht des Manuskripts, geht an Frau Antje Fischer, die mich immer und jederzeit liebevoll unterstützt und aufgemuntert hat.

Abkürzungen

α	Einstrahlwinkel
Abb	Abbildung
AFM	Atom-Kraftmikroskop (<i>Atomic Force Microscope</i>)
APTS	Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BS ³	Bis(Sulfosuccinimyl)Suberat
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CCD	Charge Coupled Device
CPG	controlled pore glass
CPM	counts per minute
dest	destilliert
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure-dinatrium
EthBr	Ethidiumbromid
FIA	Fließinjektionsanalyse
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GOPS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piparazin-1-Ethansulfonsäure
konz	konzentriert
KPP	Kaliumphosphat
λ	Wellenlänge
min	Minute(n)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	response units
s	Sekunde(n)
SPR	Oberflächen-Plasmonenresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SulfoNHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
SSC	Natriumcitrat-Puffer (<i>Sodium salt citrate</i>)
T	Temperatur
T _{hyb}	Hybridisierungstemperatur
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-acetate
TBE	Tris-borate
TE	Transversal elektrisch
TM	Transversal magnetisch
U	units
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett

I. Zielsetzung und Grundlagen	1
1. Zielsetzung	1
2. Biosensoren	1
3. Nukleinsäureanalytik und Biosensoren	3
4. Grundlagen der Nukleinsäureanalytik	8
4.1. Struktur der DNA und RNA	8
4.2. Hybridisierung: Prinzip der molekularen Erkennung	10
4.3. Kinetik der Hybridisierung	13
4.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren	13
4.5. Wechselwirkung von niedermolekularen Substanzen mit DNA	14
5. Stand der Technik der Nukleinsäureanalytik	15
5.1. Amplifikation der DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
5.1.1. Allgemeines Prinzip	15
5.1.2. Die Sonderform der asymmetrischen PCR	17
5.1.3. Amplifikation der RNA durch RT-PCR	18
5.2. Elektrophoretische Methoden	18
5.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	19
5.2.2. Kapillarelektrophorese (CE)	20
6. Stand der Technik in der Genexpressionsanalytik	21
6.1. Methoden basierend auf Sonden-Hybridisierung	22
6.2. Methoden basierend auf Polymerase Kettenreaktion	23
6.3. Methoden basierend auf Sequenzanalyse	25
6.3.1. DNA-Mikroarrays	25
 II. Material und Methoden	
1. Material	27
1.1. Chemikalien	27
1.2. Enzyme	27
1.3. Oligonukleotide und DNA	28
1.4. Puffer, Medien und Lösungen	29
1.5. Geräte und Materialien	31

2. Methoden	32
2.1. Optische Affinitätssensoren	32
2.1.1. Gitterkoppler	32
2.1.1.1. Grundlagen	32
2.1.1.2. Meßaufbau des ASI Gitterkopplers „GCS-1“	36
2.1.1.3. Verwendete Lichtwellenleiter	37
2.1.1.4. Aufbau des Fließsystems beim Gitterkoppler	38
2.1.1.5. Oberflächenmodifikationen bei Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter	39
2.1.1.5.1. Vorbehandlung und Regenerierung der Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter	39
2.1.1.5.2. Silanisierungsreaktionen für Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter	39
2.1.1.5.3. Immobilisierungsreaktionen	41
2.1.1.6. Direktsynthese von Oligonukleotiden an Lichtwellenleiter	45
2.1.2. BIAcore	49
2.1.2.1. Grundlagen	49
2.1.2.2. Verwendete BIAcore-Chips	50
2.1.2.3. Oberflächenmodifikationen der BIAcore-Chips	52
2.1.3. Meßauswertung bei den optischen Affinitätssensoren	54
2.2. Oberflächencharakterisierung	56
2.2.1. Grundlagen des Atom-Kraftmikroskops (AFM)	56
2.2.2. Meßaufbau der AFM-Apparatur	60
2.2.3. Bearbeitung und Charakterisierung der AFM-Aufnahmen	61
2.2.4. Untersuchung der Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter mit AFM	62
2.2.5. Untersuchung von DNA auf planarem Mica	62
2.3. Spezifischer Nachweis des Bakteriums <i>Escherichia coli</i> DH5α	63
2.3.1. Grundlagen	63
2.3.2. Isolierung des Plasmids pUC 19 aus Stamm <i>E. coli</i> DH5α	65
2.3.3. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von <i>E. coli</i> DH5α	66
2.3.4. Asymmetrische PCR	67
2.3.5. Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese für DNA	68
2.4. Methoden der RNA-Analytik	69
2.4.1. Hefekultivierung	70
2.4.2. Zellaufschluß und Isolation der Total-RNA	70
2.4.2.1. Grundlagen	70

2.4.2.2.	Phenolische Methode der Total-RNA-Isolation	71
2.4.2.3.	RNA-Isolation mit Hilfe des RNAeasy Kits	71
2.4.3.	Gelelektrophorese der RNA	71
2.4.3.1.	Grundlagen	71
2.4.3.2.	Durchführung der RNA-Gelelektrophorese	72
2.4.4.	Northern Blot	73
2.4.4.1.	Grundlagen	73
2.4.4.2.	Durchführung des Northern-Blots	74
2.4.4.3.	Präparation radioaktiv gelabelter Oligonukleotide	74
2.4.4.4.	Hybridisierungsexperimente mit membrangebundener RNA	75
2.4.5.	Verwendung von Magnetbeads zur Aufreinigung von Nukleinsäuren	76
2.4.5.1.	Grundlagen	76
2.4.5.2.	Präparation der Magnetpartikel	77
2.4.5.3.	Kompetitive Hybridisierung an Magnetpartikel	79
2.4.5.4.	RNA-Aufreinigungsexperimente mittels Magnetpartikel	80
2.4.5.5.	Isolierung der mRNA aus Total-RNA	80
III.	Ergebnisse	81
1.	Atom-Kraftmikroskop (AFM)	81
1.1.	Einsatz des AFM zur Charakterisierung von Biosensoroberflächen	81
1.2.	Untersuchungen zur Bindungseigenschaft von DNA an modifizierte Träger mit Hilfe des AFM	81
1.2.1.	Variation der Immobilisierungsbedingungen	81
1.2.2.	Bestimmung der Ausmaße gebundener DNA	86
1.2.3.	Schlußfolgerungen	86
1.3.	Untersuchungen der Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter mit dem AFM	87
1.3.1.	Charakterisierung der rohen und proteinbedeckten Chips	87
1.3.2.	Visualisierung und Charakterisierung der Proteinbeschichtung auf der Sensoroberfläche	90
1.3.3.	Bestimmung der räumlichen Ausdehnung von Avidin mittels AFM	95
1.3.4.	Schlußfolgerungen	96

2. Messungen am Gitterkoppler	97
2.1. Immobilisierung von Avidin bzw. Streptavidin auf Ta ₂ O ₅ -Lichtwellenleiter	97
2.1.1. Schlußfolgerungen	99
2.2. Bindung von biotinylierten Sonden	99
2.3. Hybridisierungsreaktionen und Regenerierungen am Gitterkoppler	102
2.4. Einfluß der Länge des Probenoligonukleotids	102
2.5. Einfluß der Konzentration der Probe auf das Sensorsignal	104
2.6. Regenerierungen am Gitterkoppler	106
2.7. Schlußfolgerungen	107
2.8. Nachweis von interkalierenden Verbindungen mit Hilfe des Gitterkopplers	108
2.8.1. Schlußfolgerungen	111
2.9. Direktsynthese von Oligonukleotiden an Lichtwellenleiter	111
2.9.1. Schlußfolgerungen	114
3. Messungen am BIAcore	115
3.1. Immobilisierung von Avidin bzw. Streptavidin auf BIAcore-Chips	115
3.2. Bindung von biotinylierten Sonden	117
3.3. Regenerierungen am BIAcore	121
3.4. Hybridisierungsreaktionen am BIAcore	123
3.5. Einfluß der Länge des Probenoligonukleotids auf das Sensorsignal	125
3.6. Einfluß der Konzentration der Probe auf das Sensorsignal	127
3.7. Einfluß der Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers auf das Sensorsignal	128
3.8. Schlußfolgerungen	131
4. Applikation I: Spezifischer Nachweis des Bakteriums <i>Escherichia coli</i> DH5 α	132
4.1. Aufreinigung und Isolierung	132
4.2. Hybridisierung von Plasmid pUC 19 an Gitterkoppler und BIAcore	133
4.2.1. Schlußfolgerungen	134
4.3. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	134
4.4. Nachweis von PCR-Produkten mit Hilfe optischer Detektoren	135
4.5. Schlußfolgerungen	138

5. Applikation II: RNA-Analytik	139
5.1. Ribosomale RNA : Aufreinigung und Northern Blotting	139
5.1.1. Schlußfolgerung	143
5.2. Einsatz von Magnetpartikeln in der rRNA-Aufreinigung	144
5.2.1. Kopplung über das Carbodiimid EDC	144
5.2.2. Vergleich der Kopplungsmethoden für Oligonukleotide an Magnetpartikel	147
5.2.3. Hybridisierungsreaktionen an Magnetpartikel	148
5.2.4. Hybridisierung von 5.8S rRNA an Magnetpartikel	151
5.2.5. Schlußfolgerungen	152
5.3. Genexpressionsanalytik mit optischen Biosensoren	153
5.3.1. Nachweis von Gesamt-mRNA mit optischen Biosensoren	153
5.3.2. Verfolgung des Verlaufs der RNA-Bildung während einer <i>Pichia Pastoris</i> -Fermentation	157
5.3.3. Schlußfolgerungen	160
 IV. Diskussion	 161
1. Atom-Kraftmikroskop	161
2. Messungen am Gitterkoppler	168
3. Messungen am BIAcore	173
4. Applikationen I: Spezifischer Nachweis des Bakteriums <i>Escherichia coli</i> DH5 α	177
5. Applikationen II: RNA-Analytik	181
 V. Zusammenfassung	 186
 VI. Literatur	 188

1. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Nukleinsäure-Wechselwirkungen mit Hilfe optischer Biosensoren. Die experimentellen Grundlagenarbeiten sollten aufzeigen, inwieweit die konventionellen Methoden der Nukleinsäureanalytik, wie Gelelektrophorese oder Blot-Techniken, durch die Anwendung der optischen Detektoren ersetzt bzw. ergänzt werden können. Im Mittelpunkt des Interesses standen Übertragung und Entwicklungen möglicher Nachweisstrategien für Nukleinsäuren auf optische Detektoren.

Zwei verschiedene Systeme wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt: der *Gitterkoppler* und das *BIAcore*, beides optische Biosensorgeräte, die eine Veränderung der Massebeladung über Veränderungen des Brechungsindex auf der Sensoroberfläche in Echtzeit verfolgen können. Beide Geräte haben den Vorteil, daß markierende Label, wie Fluorophore, Radioisotope oder Enzyme, nicht notwendig sind, um Bindungsereignisse zu detektieren. Die Bestimmungen von Nachweisgrenzen für Nukleinsäuren sollten zeigen, ob geringste DNA-Mengen mit einer bestimmten genetischen Information in einer Probe nachgewiesen werden können, oder ob Methoden zur Vervielfältigung der DNA, wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR) integriert werden müssen.

Neben der DNA sollte der Nachweis von RNA mit Hilfe der optischen Detektoren durchgeführt werden. An der *ribosomalen RNA* (rRNA), die in hoher Konzentration in Zellen vorhanden ist, sollte untersucht werden, wie sich die Randbedingungen für den Nachweis von RNA im Gegensatz zur DNA ändern: Statt einer doppelsträngigen Helixstruktur zeigt die einzelsträngige RNA eine vielfältige Palette komplexer Sekundär- und Tertiärstrukturen, die Auswirkungen auf die Einsetzbarkeit der Sensorgeräte haben könnten.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten auf die *messenger RNA* (mRNA)-Bestimmung übertragen werden, indem eine spezifische RNA zusammen mit der Entwicklung der gesamten mRNA über den Zeitraum der Zellkultivierung erfaßt werden sollte

Einführend jedoch sollte die Oberfläche der Sensoren mit Hilfe eines *Atom-Kraftmikroskops* in Hinsicht auf Beschaffenheit und Belegungsdichte mit biologischem Material untersucht und charakterisiert werden.

2. Biosensoren

Biosensoren setzen sich aus zwei Komponenten zusammen : der *biologischen*, zur spezifischen Erkennung eines Analyten, und der Detektorkomponente, dem *Transducer*, der diese biomolekulare Erkennungsreaktion erfassen soll.

Die selektiven biologischen Komponenten (z. B. Nukleinsäuren, Enzyme, Antikörper, Antigene oder Mikroorganismen) sind in direkter räumlicher Nähe zum Transducer immobilisiert (Scheller *et al.*, 1989), die heute ein breites Spektrum an Meßprinzipien aufweisen.

Die Spezifität des Biosensors wird durch die biologische Komponente vorgegeben, während die Empfindlichkeit vor allem durch den verwendeten Transducer beeinflusst wird.

Grundsätzlich kann man Biosensoren in zwei Gruppen unterteilen (Scheller *et al.*, 1989): Die *Enzym- oder Metabolismussensoren* setzen den Analyten metabolisch um, wobei die Zunahme eines Reaktionsproduktes quantifiziert werden kann.

Affinitätssensoren dagegen nutzen jede Art biomolekularer Erkennung, wie Antikörper-Antigen, Nukleinsäure-komplementäre Nukleinsäure oder Rezeptor-Ligand als hochspezifische Affinitätspartner. In Folge sind einige Meßprinzipien erwähnt, die in der Affinitätssensorik von besonderer Bedeutung sind (Rogers *et al.*, 1998):

- Optische Detektion, die Effekte wie Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonanz, SPR*) (Kretzschmann *et al.*, 1968), Totalreflektion von Licht in Wellenleitern (Graham *et al.*, 1992) oder Interferenzen an dünnen Schichten (*Reflektometrische Interferenzspektroskopie, RIfS*) nutzen (Brecht *et al.*, 1997). Bei optischen Methoden muß man zusätzlich zwischen Detektion ohne und mit Label unterscheiden: Letztere verwenden Fluoreszenzlabel, die häufig empfindlicher als direkte Methoden sind (Abel *et al.*, 1996).
- Elektrochemische Detektion, wie z. B. Voltametrie (Fojta *et al.*, 1995) und Amperometrie (Stiene *et al.*, 1997) nutzt elektrochemische Label aus, die eine Erkennungsreaktion auf der Oberfläche einer Elektrode nachweisen. Auch Enzyme (z. B. Peroxidasen) können verwendet werden, die eine Reaktion katalysieren, bei der ein elektrochemisch aktives Produkt entsteht.
- Akustische Detektion, die Frequenzänderungen eines piezoelektrischen Schwingquarzes durch Masseänderung hochempfindlich nachweist. Hier kommen *QCM* (*Quartz crystal microbalance*) (Caruso *et al.*, 1997) und *SAW* (*Surface acoustic wave*) (Yao *et al.*, 1994 und Welsch *et al.*, 1996) Methoden zum Einsatz.

Besonderes Merkmal der Biosensoren ist ihre *Regenerierbarkeit*, d. h. das die Wechselwirkung mit dem Analyten reversibel ist, und sie damit wiederverwendbar sind. Um mit konventionellen analytischen Verfahren, wie HPLC, GC oder Massenspektroskopie

konkurrieren zu können, wurde in der Vergangenheit versucht, kleine, portable Geräte herzustellen, die kostengünstig herzustellen sind (z. B. Blutglucosesensoren von Medisense, Cambridge, USA).

3. Nukleinsäureanalytik und Biosensoren

78 Jahre nachdem Gregor Mendel grundlegende Gesetze der Vererbung veröffentlicht hatte, identifizierte die Gruppe um Avery 1944 die Nukleinsäure DNA als Träger der genetischen Information. Als dann Anfang der fünfziger Jahre die Doppelhelixstruktur der DNA durch Watson und Crick aufgeklärt wurde, begann die Entwicklung der Molekularbiologie, die das Verständnis für den Informationsfluß innerhalb einer Zelle enorm erweiterte.

Für die Medizin und die angrenzenden Biowissenschaften entwickelten sich bis heute eine große Anzahl diagnostischer und therapeutischer Verfahren, die von der genetischen Mutationsdiagnostik über biotechnologische Genexpressionskontrolle von Fermentationsprozessen bis hin zu neuartigen gentherapeutischen Ansätzen reichen.

Man unterscheidet in der Analytik von Nukleinsäuren grundsätzlich zwischen Untersuchungen auf DNA und RNA-Ebene:

DNA-Analytik versucht vor allem, die Anwesenheit bestimmter Sequenzen im Genom eines Organismus, oder allgemeiner, in einer „Probe“ nachzuweisen. Beispiele sind vielfältig und umfassen so verschiedene Fragestellungen wie die Untersuchungen von Mutationen in Genen (Bilitewski *et al.*, 1999), die Detektion gentechnisch veränderter Organismen (GVO) oder Lebensmittel (Pietsch *et al.*, 1997) oder den Nachweis von Retroviren im Genom eines Patienten (Vet *et al.*, 1999). Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt der DNA-Analytik ist die Sequenzierung von Genen bzw. kompletten Genomen, eine Methodik zur Analyse der Basenabfolge der Erbinformation (Hacia *et al.*, 1999 und Kheterpal *et al.*, 1999).

Unter dem Begriff *RNA-Analytik* versteht man dagegen gegenwärtig hauptsächlich Genexpressionskontrolle, d. h. die Verfolgung der gebildeten messenger-RNA (mRNA).

Um Zellvorgänge in verschiedenen Stadien oder unter Einfluß verschiedener Substanzen zu verstehen, ist eine Charakterisierung der mRNA interessant, da diese transienten Moleküle die Information zur Bildung von Proteinen vom Genom zum Ribosom tragen. Neben der „Proteomanalytik“ (Aufklärung des Proteinmusters während verschiedener Zellzustände) (Parekh *et al.*, 1999 und Hochstrasser *et al.*, 1998) dient die „Transkriptomanalytik“ (Aufklärung des mRNA-Musters) als wichtiger Baustein zum Verständnis von Zellabläufen.

Abschließend sei die Methode der *Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)* erwähnt, die sowohl in der RNA- als auch in der DNA-Analytik eingesetzt wird (Raap, 1998 und Luke *et*

al., 1998). Fluoreszierende Sonden werden mit chromosomaler DNA oder RNA hybridisiert, um bestimmte Gensequenzen zu erkennen. Die spezifischen Sequenzen können z. B. der Organismencharakterisierung dienen oder das Auffinden von chromosomalen Veränderungen ermöglichen. Unter einem Fluoreszenzmikroskop sind die Sonden-markierten Positionen dann als leicht diskriminierbare Banden im Chromosom zu erkennen.

Die Verwendung von Biosensoren in der Nukleinsäureanalytik

Zuerst soll die Frage aufgeworfen werden, warum Biosensoren in der Nukleinsäureanalytik eingesetzt werden sollten und welche Perspektiven damit verbunden sind. Eine Antwort geben die in Kapitel I. 5. und II. 2.4. umrissenen konventionellen Methoden, die häufig arbeitsintensiv und zeitaufwendig sind, dazu z. T. radioaktive Nachweisverfahren einschließen.

Biosensoren sollten, um eine Alternative oder Ergänzung zu den herkömmlichen Methoden darzustellen, einfacher, schneller, regenerierbar sein und trotzdem von hoher Sensitivität und Selektivität. Der nächste Abschnitt soll einen Überblick über die aktuelle Literatur geben und einen Einblick ermöglichen, ob Biosensoren die bisher gestellten Erwartungen erfüllen konnten:

Um Biosensoren für die Nukleinsäureanalytik anwendbar zu machen, wurden in den letzten Jahren vielfältige Anstrengungen unternommen. Erste Veröffentlichungen beschrieben vor allem Wechselwirkungen von kurzen Oligonukleotiden, die noch keine direkte praktische Relevanz besaßen, sondern eher der Methodencharakterisierung dienten (Watts *et al.*, 1995).

DNA-Wechselwirkungen wurden mit Hilfe verschiedener Transducer untersucht (eine Übersicht gibt Tabelle 1.1.) : So beschrieben Nilsson *et al.* bereits 1995 die Nutzung des optischen Biosensors *BIAcore* zum Nachweis von Hybridisierungsreaktionen (Wechselwirkung zweier einzelsträngiger komplementärer Oligonukleotide) und enzymatischer Ligasereaktionen. 1997 zeigten Persson *et al.* mit Hilfe des gleichen Systems Modelluntersuchungen zum Nachweis von Punktmutationen anhand kurzer Oligonukleotide, um den Nutzen des Sensors für die medizinische Diagnostik zu evaluieren. Einen interessanten Ansatz zur Detektion einer Basenfehlstelle („mismatch“), die krankheitsauslösend sein kann, publizierten Gotoh *et al.* (1997). Sie detektierten mit dem *BIAcore* die Bindung des Proteins MutS, das mismatches erkennen und spezifisch an ihnen binden kann.

Neuere Publikationen beschäftigen sich mit dem Nachweis von vervielfältigten DNA-Sequenzen, sog. PCR-Produkten. So zeigten Kai *et al.* (1999) die spezifische Hybridisierung eines PCR-Produkts mit Hilfe des BIAcores. Damit wurden zeitaufwendigen gelelektrophoretischen Methoden Alternativen gegenübergestellt. Desweiteren präsentierten sie einen möglichen Weg, um einzelsträngige PCR-Produkte zu erhalten, die wesentlich einfacher mit oberflächengebundenen spezifischen Oligonukleotiden („Sonden“) hybridisieren können. Auch Bianchi *et al.* (1997) wiesen mit Hilfe des optischen Biosensors HIV-1 spezifische PCR-Produkte nach, indem sie einzelsträngige Produkte generierten.

Neben den zahlreichen Veröffentlichungen von Anwendungen des BIAcores, gibt es einen neuen kompakteren optischen SPR-Sensor der Fa. Texas Instruments (*TISPR-1*), der in einer ersten Veröffentlichung von Kukanskis *et al.* (1999) ebenso zum Nachweis eines PCR-Produktes aus dem HIV-Genom eingesetzt wurde.

Für grundlegende Untersuchungen von Hybridisierungsreaktionen am *Gitterkoppler* sind vor allem die Arbeiten von Bier zu nennen (Bier *et al.*, 1996a), der auch Wechselwirkungen mit DNA-modifizierenden Restriktionsenzymen zeigt (Bier *et al.*, 1996b).

Alle bisher genannten Publikationen zu optischen Biosensoren verwenden *direkte, labelfreie* Detektoren, die Änderungen der Massebelegung bzw. des Brechungsindex detektieren. Mit Hilfe *Fluoreszenz-gelabelter* Nachweisverfahren konnte die Nachweisgrenze für Oligonukleotide weiter nach unten verschoben werden (s. Tab. 1.1.). Es wurden unterschiedliche Assayformate entwickelt, um die Fluorophore zu integrieren: Bier *et al.* (1997) verwendeten den fluoreszierenden Interkalator Pico Green (Einlagerungsverbindung, die an die doppelsträngige DNA binden kann). Hybridisiert die Sonde auf der optischen Faser mit Proben-Oligonukleotid, bildet sich ein Doppelstrang, der mit dem Interkalator in Wechselwirkung treten kann. Das Fluoreszenzsignal korrelierte bei diesem Format mit der Anzahl der gebildeten Hybride. Für ein kurzes 13 bp Oligonukleotid erhielten sie ein Detektionslimit von 70 fM. Abel *et al.* (1996) nutzte dagegen ein Fluoreszenz-markiertes 16 Basenpaare (bp) langes Oligonukleotid, das an eine komplementäre Sonde hybridisierte und erhielt damit ein Detektionslimit von 200 fM. Als Transducer wurde ebenfalls eine faseroptische Apparatur genutzt, jedoch werden zunehmend auch planare Wellenleiter verwendet: So zeigten Duveneck *et al.* (1997) mit einem Fluoreszenzsensor auf Basis planarer Ta₂O₅-Wellenleiter sogar den Nachweis einer 100 fM Lösung eines mit Fluorophor (Cy-5) gelabelten 16 bp-Oligonukleotides.

Neben optischen Methoden, die in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung waren, werden in der Nukleinsäureanalytik auch *elektrochemische Verfahren* eingesetzt. Dabei wurden verschiedene Varianten realisiert, die die leichte Oxidierbarkeit der Base Guanin nutzten (Wang *et al.*, 1996a und Thorp, 1998) bis hin zu chronopotentiometrischen Ansätzen (Wang *et al.*, 1997). Einige Autoren verwendeten elektrochemisch aktive Marker, die sich in die DNA einlagern bzw. die mit hybridisierenden Proben konjugiert sind. Wang *et al.*, beschrieben 1996 die Nutzung von Kobaltkomplexen, während Marrazza *et al.* (1999) den elektrochemischen Interkalator Daunomycin anwendeten.

Anzumerken sind an dieser Stelle auch Untersuchungen zum Elektronentransport innerhalb einer doppelsträngigen DNA: Kelley *et al.* (1997) regten den Einsatz des „ π -Systems“ der DNA an, um die Hybridisierung elektrochemisch nachweisen zu können. Die DNA zeichnet sich im Innern der Helix durch eine stapelförmige Anordnung von heterocyclischen, aromatischen Basenpaaren aus, die für Elektronentransferreaktionen genutzt werden können. Napier *et al.* (1997) zeigten in ähnlichen Experimenten die Verwendung eines Rutheniumkomplexes ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$), der als Redox-Mediator dient.

Ein weiteres Prinzip sind *piezoelektrische Schwingquarze (QCMs)*, die Frequenzänderungen der Kristallschwingung detektieren, die (ideal im Vakuum) linear mit der Massebelegung ansteigen (Sauerbrey, 1959). Obwohl bereits 1988 von Fawcett *et al.* als Detektionsprinzip für Hybridisierungsreaktionen vorgestellt, gibt es bisher nur einige wenige Publikationen, die QCM verwenden. So verfolgte Caruso *et al.* (1997) die Frequenzabnahme eines 9 MHz-Kristalls, die mit der Hybridisierung eines 30 bp langen Oligonukleotids (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) an eine oberflächengebundene Sonde korrelierte.

Ein 27 MHz-Schwingquarz verwendeten Okahata *et al.* (1998), die damit Protein-Wechselwirkungen an DNA untersuchten.

Transducer	Probenlänge [bp]	Nachweisgrenze/ eingesetzte Menge	Bemerkung	Referenz
SPR (BIAcore)	244	0.15 μM	PCR-Produkt	Kai <i>et al.</i> , 1999
SPR(BIAcore)	22 + 24	- / 20 pmol	Ligase-Reaktion	Nilsson <i>et al.</i> , 1995
SPR (BIAcore)	8	31 nM / 1.5 pmol	Affinitätskonst./ mismatch	Persson <i>et al.</i> , 1995
SPR (TISPR-1)	20 + 291	- / 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	PCR-Produkt	Kukanskis <i>et al.</i> , 1999

Transducer	Probenlänge [bp]	Nachweisgrenze/ eingesetzte Menge	Bemerkung	Referenz
Gitterkoppler	22	50 nM / 150 pmol	EcoRI-Bindung	Bier <i>et al.</i> , 1996a
Gitterkoppler	13	kA / kA	mismatch	Bier <i>et al.</i> , 1996b
Resonant mirror (IAsys, Fisons)	40	9.2 nM / 0.92 pmol	PCR-Primer	Watts <i>et al.</i> , 1995
Fluoreszenz (Faseroptik)	20	13 nM	Interkalator	Piunno <i>et al.</i> , 1996
Fluoreszenz (Faseroptik)	16	200 fM / 24 fmol	markiertes Oligonukleotid	Abel <i>et al.</i> , 1996
Fluoreszenz (Faseroptik)	13	70 fM / 7 amol	Interkalator Pico Green	Bier <i>et al.</i> , 1997
Fluoreszenz (Planarer Wellenleiter)	16	100 fM/100 aM	markiertes Oligonukleotid	Duveneck <i>et al.</i> , 1997
QCM	30	0.5 µg/ml	einfache Hybridisierung	Caruso <i>et al.</i> , 1997
QCM	3650 bp	- / -	DNA-LB-Film	Nicolini <i>et al.</i> , 1997
Elektrode : Voltametrisch	4000	2.5 ng / 1.8 fmol	Co(bpy) ₃ ³⁺	Millan <i>et al.</i> , 1993
Elektrode : Amperometrisch	DNA / RNA	460-750 pg	Oxidation Guanin	Wang <i>et al.</i> , 1996a
Elektrode : Potentiometrisch	21 + 42	4 nM	Co(phen) ₃ ³⁺ Marker	Wang <i>et al.</i> , 1996b
Elektrode : Potentiometrisch	13	1-2 µg/ml	Daunomycin Interkalator	Marrazza <i>et al.</i> , 1999

Tab. 1.1. : Vergleichende Übersicht einiger Publikationen zur Nukleinsäureanalytik mit Hilfe von Biosensoren (nach: Bier und Fürste, 1997). (Verwendete Abkürzungen: LB : Langmuir-Blodgett, kA : keine Angaben gemacht, Co(phen)₃³⁺ : Tris(1,10-Phenanthrolin)kobalt(III), bpy : bipyridyl)

RNA- oder auch Genexpressionsanalytik findet im Gegensatz zur DNA-Analytik nur sehr zögerlich Eingang in die Biosensor-Forschung; zur Charakterisierung des komplexen

Expressionsmuster einer Zelle wurden sog. *DNA-Chips* etabliert, die aus Arrays mit bis zu ~175.000 kurzen Oligonukleotidsträngen /cm² bestehen. Das Hybridisierungsmuster gibt Aufschluß über die Anwesenheit bestimmter Sequenzen. Die Fa. Affymetrix gilt als Vorreiter der photolithographischen Herstellung von Hochdichte-Oligonukleotid oder cDNA-Arrays (sog. *copy DNA*, die mit Hilfe einer Reversen Transkriptase aus mRNA gebildet wird, also eine DNA-Kopie der mRNA darstellt; s. Kap. I. 5.1.3.). Proben, die mit den Sonden hybridisieren, werden mit Hilfe von Fluorophoren und einer CCD-(*charge coupled device*)-Kamera oder einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet (Saizieu *et al.*, 1998). Kapitel I. 6.3.1. beschreibt die Herstellung, Verwendung und Auswertung der DNA-Chips, die neben der Genexpressionsanalytik auch für DNA-Sequenzierungen eingesetzt werden (Wang *et al.*, 1998).

4. Grundlagen der Nukleinsäureanalytik

4.1. Struktur der DNA und RNA

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein Polymer aus Nukleotiden. Grundbausteine der Nukleotide sind phosphorylierte Zucker (für die DNA : Desoxyribose) und die Purin- bzw. Pyrimidinbasen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, die über eine N-glykosidische Bindung an das Zuckergerüst gebunden sind. Die Verknüpfung zum Polymer erfolgt durch Verbrückung der Zuckerreste über die Phosphatgruppen. Charakteristisch für die DNA eines bestimmten Organismus ist die Abfolge (Sequenz) der 4 Basen, da in ihr die genetische Information gespeichert ist. Ribonukleinsäure (RNA) besitzt dagegen den Zucker Ribose und statt der Base Thymin die Base Uracil.

Anfang der fünfziger Jahre gelang Watson und Crick (Watson *et al.*, 1953) sowie Rosalind Franklin (Piper, 1998) aus Daten der Röntgenstrukturanalyse die Entwicklung des *Modells der Doppelhelix*, die aus jeweils zwei gegenläufigen DNA-Einzelsträngen aufgebaut ist.

Ausgehend von der von Chargaff 1950 durch Untersuchungen an einer Vielzahl verschiedener Organismen gemachten Regel, daß jeweils die gleiche Anzahl der Basen Adenin und Thymin, bzw. Guanin und Cytosin vorhanden ist, wurde das Modell der Basenpaarung postuliert. Abbildung 1.1. zeigt den Aufbau einer Doppelhelix und die Ausmaße des Moleküls :

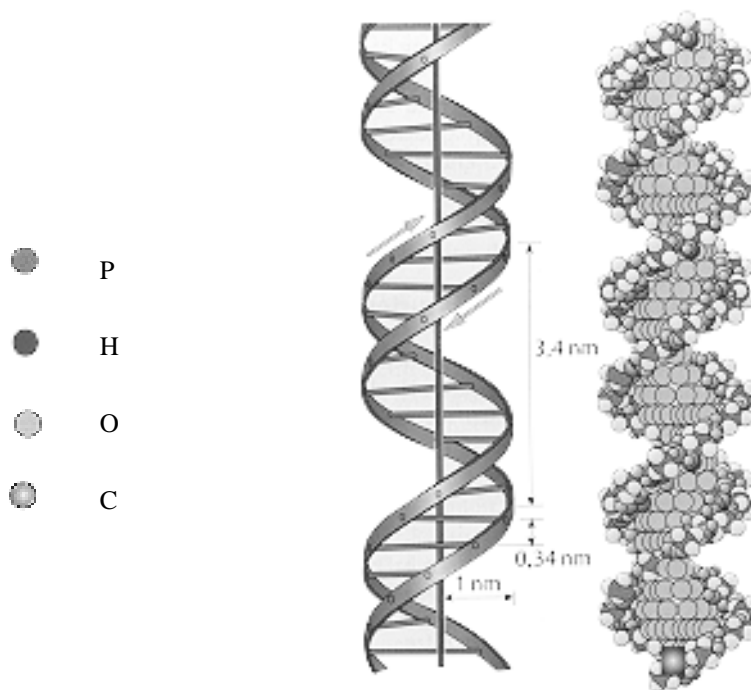


Abb. 1.1. : Schematischer Aufbau einer DNA-Doppelhelix nach Watson-Crick (aus: Knipper, 1997).

Im Unterschied zur DNA kommt die einzelsträngige RNA in verschiedenen Typen vor, die in der Zelle variierende Aufgaben wahrnehmen. Tabelle 1.2. zeigt den unterschiedlichen Anteil der einzelnen RNA-Typen an der Total-RNA. So hat die messenger RNA (mRNA), die die genetische Information von der DNA zu den Ribosomen, den Ort der Proteinsynthese, transportiert, im Vergleich zu anderen Arten der RNA einen lediglich kleinen Anteil. Den größten Anteil in Zellen hat die ribosomale RNA (rRNA), die, in verschiedenen Varianten vorkommend, strukturgebender Baustein der Ribosomen ist. Ebenso häufig ist die transfer RNA (tRNA), die einzelne Aminosäuren, Bausteine der Proteine, zu den Ribosomen transportiert. Daneben kommen in geringer Anzahl verschiedene RNAs vor, die z. T. als Precursor für die funktionellen RNAs dienen.

Art der RNA	Anteil an der Total-RNA
MRNA	1 - 5 %
TRNA	10 – 15 %
RRNA 28S, 18S, 5.8S und 5S rRNA	75 – 80 %
andere RNAs, z. B. snRNA (small nuclear RNA)	< 5 %

Tab. 1.2. : Anteil verschiedener RNA-Arten an der Total-RNA einer eukaryontischen Zelle (Darling et al., 1996 und Krieg et al., 1998).

Ribonukleinsäuren bilden als Einzelstränge (mit Ausnahme einiger doppelsträngiger Virus-RNAs) komplexe *Sekundärstrukturen* aus, die wie bei der DNA durch spezifische Basenpaarungen entstehen. Haarnadelschleifen und Loops sind häufige Strukturelemente der RNA, die z. B. für die ribosomale RNA wichtige Voraussetzungen für deren zelluläre Aufgabe als Strukturelement in Ribosomen, oder bei der transfer RNA für die Präsentation der jeweiligen Aminosäure darstellen.

4.2. Hybridisierung : Prinzip der biomolekularen Erkennung

Die komplementären Basen einer DNA sind über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft, die z. B. durch Erhitzen („Schmelzen“) gelöst werden können. Durch Abkühlen der Lösung entdeckte man eine basenrichtige Wiederanlagerung der Einzelstränge (Hybridisierung), womit die Grundlage für diagnostisch einsetzbare, sequenzspezifische Hybridisierungsmethoden gelegt war.

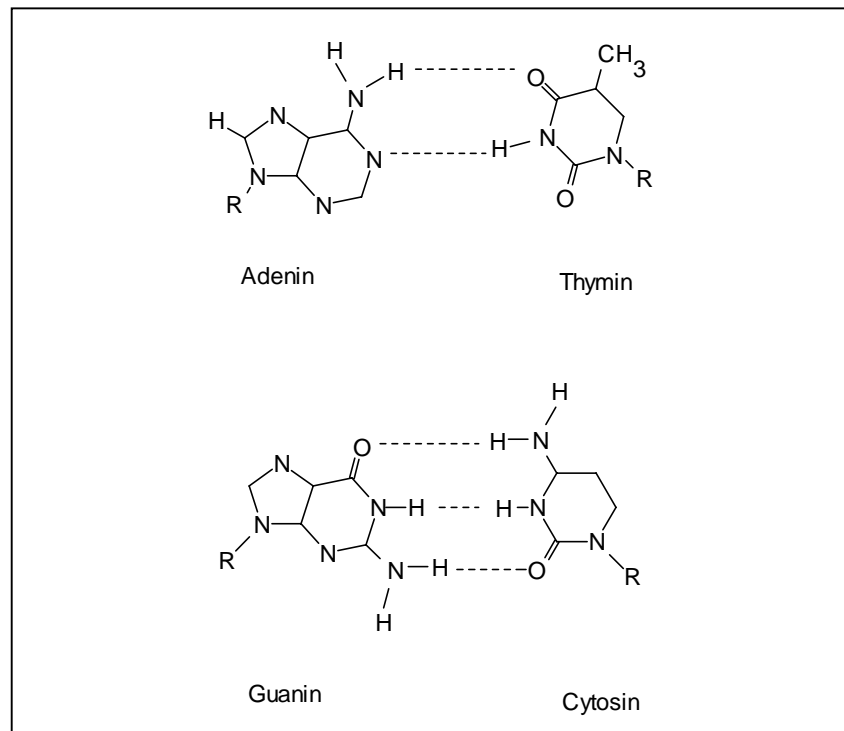


Abb. 1.2 : Komplementäre Basenpaarung in DNA: Guanin (G) und Cytosin (C) bilden jeweils drei, Adenin (A) und Thymin (T) jeweils zwei Wasserstoffbrücken aus.

In der RNA finden ähnliche Basenpaarungen statt, d. h. es treten Adenin-Uracil (das das Thymin ersetzt) und Guanin-Cytosin-Paare auf, jedoch kann es auch zu Guanin-Uracil-Basenpaarungen kommen (Lehniger *et al.*, 1994).

Allen Hybridisierungsformaten gemeinsam ist der Einsatz von sequenzspezifischen Sonden, die mit der zu untersuchenden Nukleinsäure („Probe“) hybridisieren soll. Häufig wird die Probe auf einen festen Träger aufgebracht („geblottet“) und mit einer markierten Sonde inkubiert.

Die *Stringenz der Hybridisierung*, d. h. ihre Spezifität, hängt von verschiedenen Parametern ab, deren Wahl das Ergebnis des Experiments entscheidend beeinflusst :

- **Temperatur**

Von entscheidender Bedeutung für die Hybridisierung ist die Wahl der Temperatur, die durch den Schmelzpunkt T_m des Doppelstranges determiniert wird. Ein hoher Gehalt an G-C, die jeweils durch drei H-Brücken verbunden sind, stabilisieren die Duplex und bewirken eine höhere Schmelztemperatur. Die optimale Hybridisierungstemperatur T_{Hyb} für kurze Oligonukleotide (Lottspeich *et al.*, 1998) liegt für stringente Bedingungen 5-15°C niedriger als T_m .

- **Salzkonzentration**

DNA ist durch die Phosphodiesterbrücken ein stark negativ geladenes Molekül. Die Nähe der beiden Einzelstränge erzeugt eine starke Coulomb'sche Abstoßung, die durch Anwesenheit von monovalenten Ionen abgeschirmt werden kann. Höhere Ionenstärke erhöhen damit die Stabilität des Doppelstranges. Bei Salzkonzentrationen $< 0.1 \text{ M Na}^+$ ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit sehr langsam; ein Anstieg auf 0.2 M Na^+ bewirkt eine 5 bis 10-fach höhere Reaktionsrate (Anderson *et al.*, 1985).

- **Zugabe von Formamid**

Formamid (FA) destabilisiert die Duplexbildung durch Hemmung der Ausbildung von H-Brücken. Da es die Schmelztemperatur signifikant erniedrigt (1% FA erniedrigt T_m um 0.7°C (McConaughy *et al.*, 1969), wird es häufig eingesetzt, um die Stringenz der Hybridisierung zu variieren.

- **Zugabe von Polymeren**

Dextransulfat (Wetmur, 1975), Polyacrylsäure (Miller *et al.*, 1988) oder Polyethylenglykol (Amasino, 1986) haben einen wasserentziehenden verdrängenden Einfluß, der die effektive Konzentration an Nukleinsäure erhöht. Damit erhöht sich ebenso die Reaktionsgeschwindigkeit der Hybridisierung.

Um die Schmelztemperatur für DNA-Duplexe zu berechnen, gibt es mehrere empirische Näherungen (Howley *et al.*, 1979), wobei die Formel (1) in dieser Arbeit angewendet wurde (Lottspeich *et al.*, 1998):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \lg[\text{Na}^+] + 0.41(\%G+C) - 675/n \quad (1)$$

mit : n : Länge des hybridisierenden Sequenzabschnittes.

$[\text{Na}^+]$: molare Konzentration der Na^+ -Ionen.

Für Längen $> 100 \text{ bp}$ entfällt der letzte Subtrahend der Gleichung.

Da eine Basenfehlpaarung („mismatch“) von 1% innerhalb einer Duplex eine Erniedrigung der Schmelztemperatur von bis zu 5°C zur Folge haben kann, wird in Hybridisierungsassays versucht, die Randbedingungen so zu wählen, daß nur komplementäre Basenpaarung möglich

ist. Mit dieser hohen Stringenz ist eine Detektion von Punktmutationen (Austausch einer einzelnen Base) realisiert worden (Wartell *et al.*, 1998 (mit TGGE) und Healey *et al.*, 1998).

4.3. Kinetik der Hybridisierung

Hybridisierungen in Lösung folgen einer Kinetik 2. Ordnung (Young *et al.*, 1985). Ist die Sonde dagegen festphasen-gebunden, reduziert sich die Hybridisierungsrate um den Faktor 5 bis 10; bei Überschuß an Probe verläuft die Reaktion annähernd 1. Ordnung (Bryan *et al.*, 1986).

Die Gleichung (2) zeigt den Zusammenhang zwischen der Hybridisierungszeit $t_{1/2}$ [s], zu der 50 % der Probe mit Sonden reagiert haben, Probenlänge L (Anzahl der Basenpaare) und Probenkonzentration C (Meinkoth *et al.*, 1984 und Wetmur *et al.*, 1968):

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{K_n (L^{1/2}) C} \quad (2)$$

mit N : Komplexität der Probe ($N \equiv L$ für eine Probe ohne sich wiederholende Sequenzen)

K_n : Reaktionskonstante ($K_n = 3.5 \times 10^5$ für $[Na^+]$ im Bereich 0.4 bis 1 M, pH 5-9 und Hybridisierungstemperatur von $T_m - 25^\circ C$)

Typische Zeiten für $t_{1/2}$ bei einer Probenkonzentration von 1 nM sind 148 min für eine 20 bp Probe, 330 min für eine 100 bp Probe und bereits 17.4 h für eine Probe, die 1000 bp lang ist.

Die kinetischen Betrachtungen haben große Auswirkungen auf den Aufbau eines Biosensors. In den meisten Fällen ist die Sonde auf einer festen Oberfläche fixiert, während die Probe frei in der Lösung vorliegt. Um die Hybridisierungsreaktion signifikant zu beschleunigen, sollten Probe und Sonde möglichst kurz, jedoch von ausreichender Spezifität sein (beim humanen Genom : Probe ≥ 17 bp). Zusätze wie Dextransulfat erhöhen die Hybridisierungsgeschwindigkeit zusätzlich.

4.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei 260 nm. Verantwortlich für die Absorption sind die aromatischen Ringsysteme der Basen. Ausgenutzt wird der Zusammenhang, daß eine Lösung, die 50 µg/ml

DNA enthält, eine *optische Dichte* von $OD = 1$ besitzt (Lottspeich *et al.*, 1997). Nicht basengepaarte Nukleinsäuren (wie RNA oder kurze Oligonukleotide) besitzen aufgrund der sog. *Hyperchromie* (Knippers, 1997) eine höhere Absorption.

Bei Messungen in 1 cm Quarzküvetten liefern etwa:

50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA

40 $\mu\text{g/ml}$ RNA und

33 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide jeweils eine $OD = 1$ (Knippers, 1997 und Ultrospec 3000 Handbuch, Pharmacia, 1995).

4.5. Wechselwirkung von niedermolekularen Substanzen mit DNA

Neben Enzymen und verschiedenen Proteinen, die in der Transkription und Replikation der DNA eine große Rolle spielen, haben niedermolekulare Substanzen die Möglichkeit, mit der Nukleinsäure Komplexe zu bilden. Dabei können die sog. große bzw. kleine Furche der DNA-Doppelhelix als Bindungsstellen dienen, oder kleine Moleküle schieben sich zwischen die Basenpaare der Helix (*Interkalation*) und interagieren mit den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäurebasen.

Häufig bestehen solche Einlagerungsverbindungen aus planaren Ringstrukturen, wie das in Darstellung 1.3. gezeigte Ethidiumbromid. Aus toxikologischer Sicht sind diese Moleküle von Bedeutung, da sie zu Fehlern beim Ablesen der genetischen Information sowie bei der Vervielfältigung der DNA führen können: Zerstörung der Zelle und Tumorbildung wurden häufig beobachtet (Andres *et al.*, 1998).

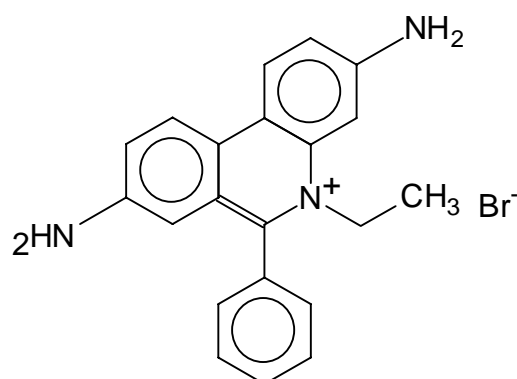


Abb. 1.3.: Ethidiumbromid als Beispiel einer aromatischen Verbindung, die sich in den Doppelstrang der DNA einlagert (interkaliert).

5. Stand der Technik der Nukleinsäureanalytik

Die analytische Zielrichtung der Nukleinsäureanalytik ist vielfältig: Die Bandbreite verläuft von der Sequenzanalyse, über Charakterisierung von Organismen oder Mutationsdiagnostik auf DNA-Ebene (Genomanalyse) bis zur Genexpressionsanalytik auf RNA-Ebene (Transkriptomanalyse). Die Methoden und Prinzipien weisen jedoch häufig Gemeinsamkeiten auf und sind mit leichten Abwandlungen übertragbar. Im folgendem sollen Methoden der Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleinsäuren dargestellt werden. Anschließend werden wichtige Methoden zur Längencharakterisierung von Nukleinsäuren, wie Gel- und Kapillarelektrophorese verdeutlicht. Abschließend sollen in einer Übersicht die Methoden zur Genexpressionsanalytik dargestellt werden.

5.1. Amplifikation der DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

5.1.1. Allgemeines Prinzip

Seit der Entwicklung der PCR im Jahre 1985 durch Kary Mullis hat die Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) beliebiger DNA-Sequenzen die Molekularbiologie revolutioniert (Saiki *et al.*, 1985): Benötigte man für den Nachweis von DNA per Gelelektrophorese mit Hilfe eines fluoreszierenden Interkalators wie Ethidiumbromid noch ca. 5 ng DNA (bei einem 200 bp langen Segment ungefähr 5×10^{10} Moleküle), so reicht heutzutage *eine einzige Ursprungs-DNA* aus. Mit Hilfe der PCR gelingt es (theoretisch und bei optimalen Randbedingungen) aus dieser Ursprungs-DNA („Template“) ca. 10^{12} identische Nukleinsäurekopien herzustellen (Newton *et al.*, 1997).

Die Methode nutzt das Charakteristikum der DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, wenn am 3'-Ende eine freie Hydroxylgruppe zur Verfügung steht. Mullis machte Gebrauch von kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden, sogenannten *Primern*, die spezifisch an bestimmten Regionen eines Templates binden konnten. Die Primer begrenzen den zu vervielfältigenden DNA-Bereich, wobei ein Primer am sog. sense-Strang des Templates hybridisiert, dem Strang, der bei der Transkription abgelesen wird. Der zweite Primer dagegen bindet an dem antisense-Gegenstrang. Die Polymerase synthetisiert nun entlang des Ursprungsstrangs eine jeweils neue DNA, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Im Prinzip besteht die Polymerase Kettenreaktion aus mehreren Amplifikationszyklen, wobei in jedem Zyklus ein Temperaturprofil durchfahren wird (Abb. 1.4. verdeutlicht den Ablauf des Prozesses):

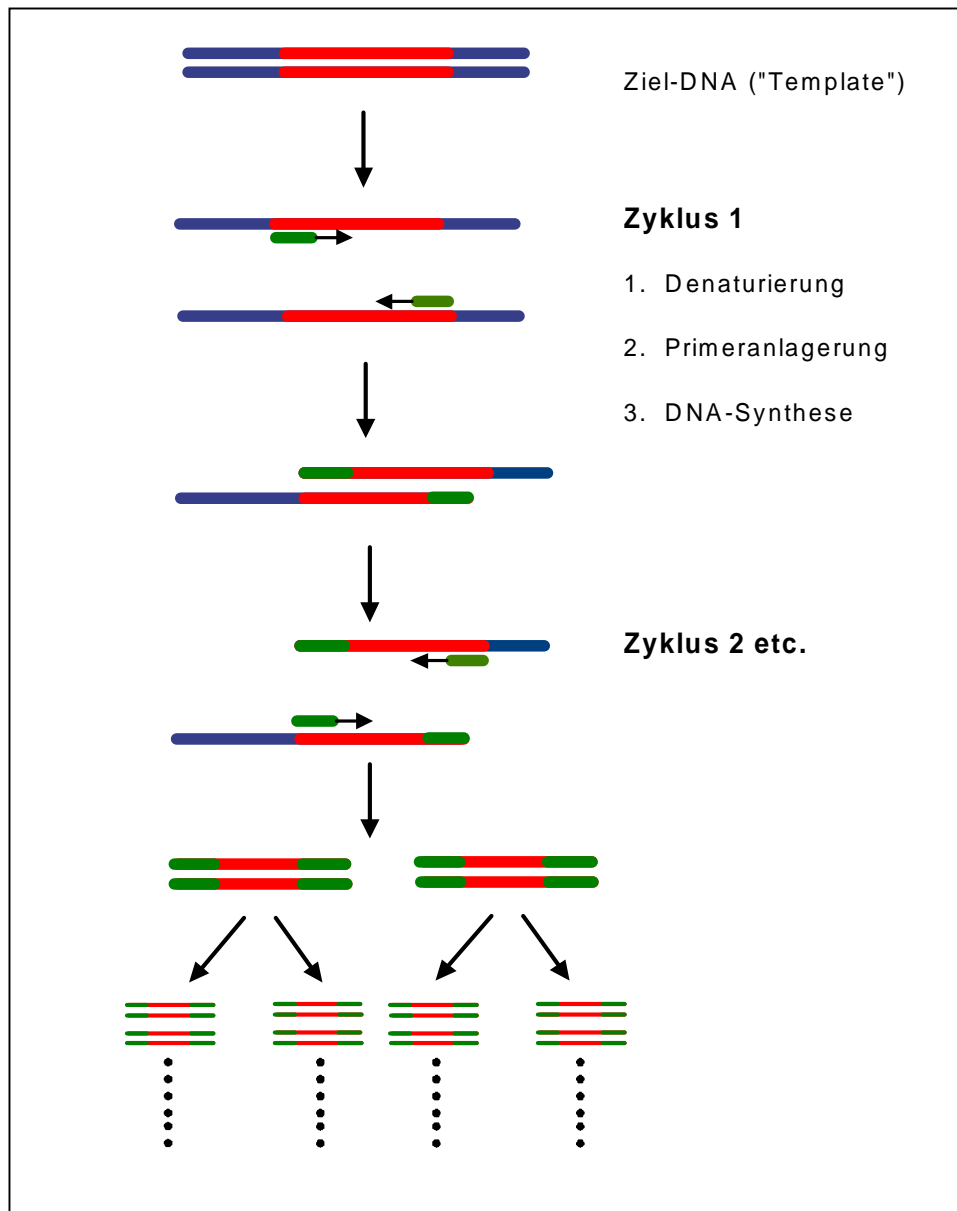


Abb. 1.4. : Schematisierter Ablauf der Polymerase Kettenreaktion.

Bei der *ersten Temperatur* erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA. Die Probe wird für kurze Zeit (30-120 s) auf 95°C aufgeheizt, um einzelsträngige Produkte zu erhalten.

Die *zweite Temperatur*, wieder für einige Sekunden gehalten, wird so gewählt, daß die Hybridisierung der beiden Primer (sog. *Annealing*) optimal ist. Unspezifische Hybridisierung soll dadurch möglichst vermieden werden.

Die *dritte Temperatur* dient der sog. *Extension*, der Verlängerung der DNA durch die Polymerase. Das Temperaturoptimum der häufig verwendeten Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) liegt bei 72°C, bei der das Enzym mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nukleotide/s den neuen Strang synthetisieren kann (Newton *et al.*, 1997).

Nach Ablauf der Primerverlängerung erfolgt der nächste Zyklus, der wieder mit dem Denaturierungsschritt beginnt.

In den ersten Runden der PCR werden noch DNA-Stränge von nicht definierter Länge synthetisiert, während ab der dritten Runde dann vermehrt die Zielsequenz gebildet wird. Die Primer begrenzen die durch die PCR vervielfältigte DNA-Sequenz.

Vom vierten Zyklus an verläuft die Reaktion mit exponentieller Zunahme an Produkt, so daß für die meisten Anwendungen 25-30 Zyklen ausreichen, um eine nachweisbare Menge an Amplikon zu erzeugen.

Eine hohe Anzahl von Zyklen hat zur Folge, daß sich neben der millionenfachen Vermehrung an PCR-Produkt die Reaktionskinetik verändert. Die exponentielle Zunahme klingt ab, bedingt durch z. B. Hitzeinaktivierung der Polymerase. Mit hoher Konzentration an PCR-Produkten vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert (Newton *et al.*, 1997).

5.1.2. Die Sonderform der asymmetrischen PCR

Die asymmetrische PCR ist eine spezielle PCR-Technik, bei der einer der beiden Primer im Überschuß vorliegt, so daß in der Folge selektiv *ein* Strang amplifiziert wird. Ziel dieser Technik ist also die Produktion *einzelsträngiger PCR-Produkte*, die keiner zusätzlichen Denaturierung vor einer nachgestellten Hybridisierungsreaktion bedürfen. Entwickelt wurde die Methode zur Didesoxysequenzierung von DNA, für die der Einzelstrang als Matrize benutzbar ist von Gyllenstein *et al.* (1988).

Mit Hilfe der asymmetrischen PCR kann man ein Template direkt amplifizieren, jedoch ist es häufig einfacher, eine symmetrische PCR vorweg durchzuführen, um doppelsträngiges Produkt zu erhalten. Nach einigen Zyklen ist der eine Primer verbraucht, jedoch synthetisiert die Polymerase weiteres Produkt mit Hilfe des überschüssigen Primers. In den ca. 20-30

Zyklen der asymmetrischen PCR ist allerdings statt mit einer exponentiellen mit einer lediglich linearen Zunahme an Produkten zu rechnen.

5.1.3. Amplifikation der RNA durch RT-PCR

Zum Nachweis geringster Mengen an RNA führt man eine Polymerase Kettenreaktion mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (*RT-PCR*) durch. In der Natur werden diese Enzyme zum Umschreiben von RNA in DNA von Retroviren benutzt, die damit ihre virale Information in das Genom der Wirtszelle integrieren können.

Mit der *RT-PCR* kann ein spezifisches RNA-Molekül unter 10^8 anderen detektiert und vervielfältigt werden (Lottspeich *et al.*, 1998). Im ersten Schritt bindet ein spezifischer Primer an der relevanten Sequenz der einzelsträngigen Proben-RNA. Die Reverse Transkriptase (häufig aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus, MMLV-RTase, oder dem Avian-Myoblastosis-Virus, AMV-RTase) bindet an dem doppelsträngigen Segment und synthetisiert in 3'-Richtung den als copyDNA (cDNA) bezeichneten Gegenstrang. Dieser dient im nächsten Schritt als Vorlage für einen zweiten Primer. Hier setzt die eigentliche PCR an, die durch die Anwesenheit einer Taq oder Tth-Polymerase katalysiert wird.

Um über das Ausmaß der Expression eines bestimmten Gens Informationen zu erhalten, benötigt man quantitative Angaben über die gebildete mRNA-Menge. Die *quantitative RT-PCR* ermöglicht durch Vergleich mit verschiedenen Mengen an interner Kontrolle (artifizielle RNA-Probe) auf dem Gel eine Abschätzung der Menge der gesuchten mRNA (Ferré *et al.*, 1995 und Collins *et al.*, 1995).

5.2. Elektrophoretische Methoden

Der Begriff *Elektrophorese* beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren wandern als negativ geladene Moleküle zur positiven Elektrode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit entscheidend beeinflusst wird durch :

- die angelegte *Potentialdifferenz*, die Triebfeder der elektrophoretischen Bewegung.
- die Art der *Matrix*, durch die sich die Nukleinsäure bewegt. Häufig kommt ein Gel aus Agarose (ein langkettiges Polysaccharid aus Seetang) oder Polyacrylamid zum Einsatz (Martin, 1996).
- die *Größe* und *Form* (doppel- oder einzelsträngig, spiralisiert oder linearisiert) der Nukleinsäure: Kleinere Moleküle bewegen sich schneller als größere, wobei das Verhältnis aus Masse m und Ladung z von zentraler Bedeutung für die Elektrophorese ist.

Das Verhältnis m/z ist für Nukleinsäuren annähernd konstant, so daß Moleküle gleicher Länge (unabhängig von der Sequenz) auch die gleiche Wegstrecke pro Zeiteinheit zurücklegen.

Neben der klassischen Agarose-Gelelektrophorese, gewinnt die Kapillarelektrophorese einen immer größeren Stellenwert für die Trennung von Nukleinsäuren und soll daher im weiteren ebenfalls besprochen werden.

5.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele bestehen aus einer festen Matrix, die, eingelegt in eine Pufferlösung, zahlreiche Poren enthalten, durch die Nukleinsäuremoleküle wandern müssen. Agarose, ein langkettiges Polysaccharid gewonnen aus Seetang, wird zur Herstellung der Gele in Puffer gegeben und durch Erhitzen in Lösung gebracht. Die abkühlende viskose Lösung wird in eine Form gegossen, wobei beim Erstarren durch einen eingelegten Kunststoffkamm Geltaschen entstehen, die der Probenauftragung dienen. Die Dicke der Gele, die nach ca. 30 min ausgehärtet sind, beträgt zwischen 5 bis 10 mm.

Für die Beweglichkeit der Nukleinsäuren im Gel sind die *Porengrößen* relevant, die durch die Konzentration der Agarose variieren (~150 nm Porengröße für ein 1 %iges Gel und ~500 nm für 0.16 % Agarose (Lottspeich *et al.*, 1998)). Für die Untersuchung kleinerer Nukleinsäurefragmente (< 250 bp), wählt man zur effektiveren Auftrennung eine hohe Konzentration von 1.5 - 2 % Agarose. Größere Fragmente, wie Plasmide oder chromosomale DNA können dagegen in 0.5 - 1.5%igen Agarosegelen, relativ großporigen Gelen, aufgetrennt werden.

Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen führt man die Auftrennung bei Feldstärken um 5 V/cm durch. Um den Verlauf der Proben während der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, gibt man farbige Marker wie Bromphenolblau (BPB) oder Xylencyanol (XC) dazu. BPB läuft mit der Geschwindigkeit eines Nukleinsäuresegment von 500 bp, während XC analog einem 9000 bp-Segment verläuft (Martin, 1996).

Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung (je nach Gellänge und Länge der Nukleinsäuresegmente zwischen 1-3 h) wird das Gel entnommen und in eine Lösung eingelegt, die eine fluoreszierende Einlagerungsverbindung (Interkalator) enthält (s. auch Kap. I. 4.5.). Kommerziell erhältliche Substanzen, wie SYBR Green (Absorptionsmaxima bei 482, 284 und 382 nm) bzw. SYBR Gold (Molecular Probes) diffundieren während einer 30 minütigen Inkubationszeit in die Gelmatrix ein und treten in Wechselwirkung mit den

Nukleinsäurenmolekülen. Alternativ kann der Interkalator schon *vor* Auftrag der Proben diesen zugesetzt werden, jedoch wurde beobachtet, daß sich das Laufverhalten der Nukleinsäuren, an die Interkalatoren gebunden haben, geringfügig verändert wird. Im Anschluß an die Färbung kann das Gel entnommen und unter UV-Licht untersucht werden. Mit Hilfe von CCD-Kameras oder Polaroidgeräten können die Gele dokumentiert werden.

Agarosegele sind leicht herzustellen und ungiftig. Desweiteren gibt es derivatisierte Agarose, wie *low-melting Agarose*, die der leichteren Isolierbarkeit von Nukleinsäurebanden aus Gelen dient (Lottspeich *et al.*, 1998) oder *sieving Agarose*, die zur Auftrennung besonders kleiner Fragmente eingesetzt wird und Trennbereiche ähnlich einem Polyacrylamidgel erreicht (Auflösung von 2-3 bp, Martin, 1996).

Ein wesentlicher Nachteil der konventionellen Gelelektrophorese ist allerdings einer hoher Zeitbedarf von einigen Stunden.

5.2.2. Kapillarelektrophorese (CE)

Die Auftrennung der Proben erfolgt anders als bei der klassischen Gelelektrophorese in einer dünnen Kapillare mit einem Innendurchmesser von $\leq 100 \mu\text{m}$. Als Trennmatrix werden Puffer eingesetzt, die einerseits den Stromtransport durch die Kapillare gewährleisten, andererseits den pH-Wert im Trennbereich konstant halten.

Die Kapillare, die aus *fused silica* (amorphes Quarz) hergestellt sind, bieten den Vorteil einer geringen *Konvektion*, da bei dem großen Verhältnis von Oberfläche/Innendurchmesser eine gute Wärmeabführung gewährleistet ist. Dadurch wurden größere Feldstärken und kürzere Trennzeiten realisiert.

Prinzipieller Meßablauf und Aufbau der Kapillarelektrophorese

Zur Durchführung einer CE tauchen die beiden Enden der dünnen Kapillare, die zwischen 20 - 100 cm lang sein kann, in je zwei Puffergefäße. Zwei Elektroden, die mit einer Hochspannungsquelle verbunden sind, tauchen in die Reservoirs und erzeugen eine Potentialdifferenz bis zu 30 kV. Abbildung 1.5. zeigt schematisch den Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur :

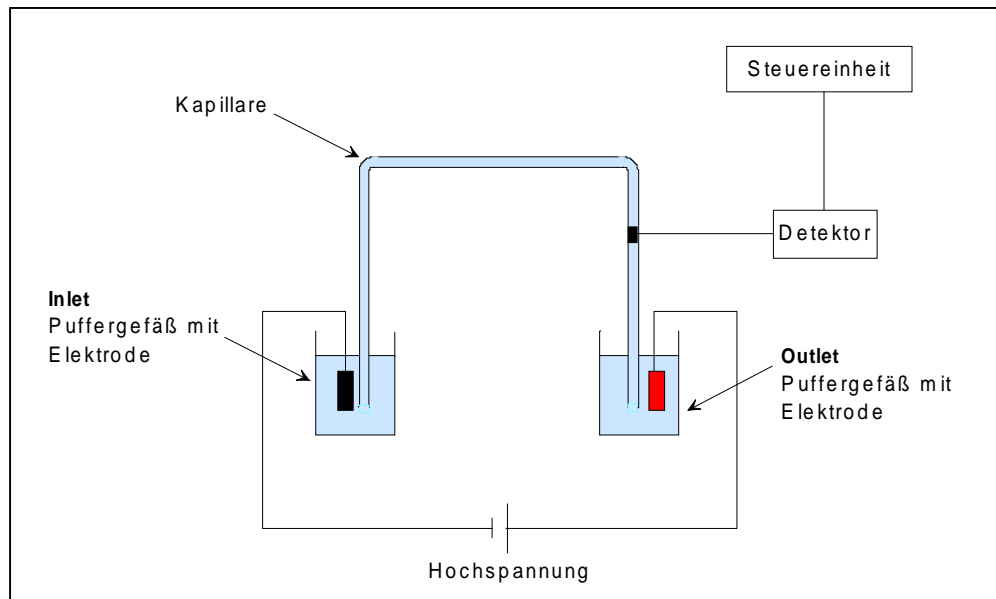


Abb. 1.5.: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur.

Ein Spalt am Ende der Kapillare, der wenige Millimeter breit ist, dient der Detektion, für die häufig UV- bzw. Fluoreszenzdetektoren, seit neuerem auch Massenspektrometer verwendet werden. Für eine Messungen werden nur wenige Nanoliter Probe mittels Druck oder elektrophoretischer Wanderung in die Kapillare injiziert. Um die Auflösung der untersuchten Nukleinsäurefragmente zu erhöhen, können Polymere, wie z. B. Agarose, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidon oder Dextran (Henze, 1999) dem Trennpuffer zugesetzt werden. Neben diesem sog. *dynamischen Coaten* können auch bereits beschichtete Kapillaren verwendet werden (*stationäres Coaten*).

Henze (1999) konnte mit Hilfe einer CE und Fluoreszenzdetektion die Analysezeit für Fragmente zwischen 24-160 bp auf unter 20 min optimieren und eine Auflösung von 2-3 bp erreichen. Neuere Entwicklungen der Kapillarelektrophorese auf Basis planarer Mikrochips konnten die Trenndauer sogar auf wenige Sekunden verkürzen und die Trennung in Kapillarenarrays mit bis zu 96 Trennkanälen parallelisieren (Simpson *et al.*, 1998 und Manz, 1997).

6. Stand der Technik in der Genexpressionsanalytik

Gegenwärtig existieren eine Reihe von Methoden zur Analyse des mRNA-Musters einer Zelle (s. Tab. 1.3.). Unterscheiden kann man zwischen Varianten, die auf Hybridisierung von Sonden, einer Vervielfältigung durch PCR oder Sequenzanalytik basieren. Einige Methoden

ermöglichen Aussagen über das Auftreten einer einzigen mRNA, andere geben ein differentielles Muster der RNA-Verteilung wieder.

Methoden zur Charakterisierung der Genexpression	
Methoden basierend auf Sonden-Hybridisierung	Northern Blot Ribonuklease-Assay : Nuklease-S1-Assay, Ribonuklease-Protektions-Assay (RPA) Nuclear-Run-on-Assay DNA-Arrays
Methoden basierend auf Polymerase Kettenreaktion	RT-PCR Differential Display Primerverlängerung
Methoden basierend auf Sequenzanalyse	DNA-Arrays

Tab. 1.3. : Methoden zur Charakterisierung der Genexpression.

6.1. Methoden basierend auf Sonden-Hybridisierung

RNA-Analyse durch Blotverfahren

Beim sog. *Northern-Blot-Verfahren* (s. auch Kap. II. 2.4.4.) werden, im Anschluß an eine Gelelektrophorese separierte RNA-Moleküle auf eine geeignete Trägermembran transferiert und mit Hilfe radioaktiver Sonden nach spezifischen Sequenzen gescreent (Alwine *et al.*, 1977). Mit Northern-Blots ist man jedoch nicht in der Lage, quantitative Aussagen über die Transkription eines bestimmten Gens zu treffen (Darling *et al.*, 1996). Trotzdem wird die Methode häufig herangezogen, um eine Aussage über die relative Menge spezieller Transkripte in verschiedenen Zellzuständen zu erhalten. Entscheidend für einen solchen Vergleich ist die Auftragung jeweils gleicher Mengen an Total-RNA.

Bei der verwandten *Dot- oder Slot-Blot-Analyse* wird auf eine Gelelektrophorese verzichtet, und die RNA-Mischungen werden direkt auf Membranen aufpipettiert. Die runden oder schlitzförmigen Spots dienen der schnellen Analyse bei einer hohen Zahl von zu untersuchenden Proben, erlauben jedoch lediglich eine rein qualitative Aussage über das Auftreten einer spezifischen mRNA (Kafatos *et al.*, 1979).

RNA-Analyse mit Ribonukleasen

Der *Nuklease-S1-Assay* (Berk *et al.*, 1977) und der *Ribonuklease-Protektions-Assay (RPA)* (Melton *et al.*, 1984) basieren im Gegensatz zu den beiden beschriebenen Blotverfahren mit Hybridisierungen an der festen Phase (Membran) auf „In-Lösung-Reaktionen“ zwischen einer spezifischen Sonde und der RNA. Nicht hybridisierte Nukleinsäure, die nach einer Inkubationszeit nach wie vor einzelsträngig vorliegt, wird durch Zugabe von Nuklease S1 abgebaut, während das Enzym das gesuchte doppelsträngige Fragment nicht verdauen kann. Ist die Sonde z. B. radioaktiv markiert, kann nach Abschluß des Nuklease-Verdaus die Anwesenheit des Produkts über Gelelektrophorese und Autoradiographie (Quantifizierung über einen Röntgenfilm) nachgewiesen werden.

Bestimmung der RNA-Syntheserate: Nuclear-run-on-Assay

Alle beschriebenen Methoden beschreiben den steady-state Gehalt einer spezifischen mRNA-Spezies in einer Probe. Im Vergleich dazu erlaubt dieser Assay zusätzlich eine Charakterisierung der *in-vivo Promoteraktivität* eines Gens.

Experimentell werden dazu die Zellkerne von den übrigen Zellkompartimenten durch schonende Methoden (nicht-ionische Detergenzien) abgetrennt (Elferink *et al.*, 1996). Zugegebenes, radioaktiv markiertes α -³²P-UTP wird in mRNA eingebaut, deren Prozessierung noch vor der Zelllyse initiiert wurde. Somit erhält man radioaktive mRNAs als Produkt, die das Muster der Genexpression widerspiegeln. Durch Dot- oder Slot-Blot-Analyse (s. oben) erfolgt eine Identifizierung der gewonnenen mRNAs.

6.2. Methoden mit Polymerase Kettenreaktion

RNA-Analyse mit Differential Display

Die 1992 entwickelte Methode basiert auf dem Einsatz von PCR zur Charakterisierung unterschiedlicher Genaktivitäten in Zellen, mit deren Hilfe die Identifizierung und Klonierung

relevanter Gene ermöglicht wird (Liang *et al.*, 1992, 1993). Bei einer Vielzahl verschiedener Zellen wurde diese Methode bereits erfolgreich eingesetzt.

Nach der Isolierung der mRNA aus den zu vergleichenden eukaryontischen Zellen wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase cDNA hergestellt, wobei sog. *anchored Primer* verwendet werden. Diese Oligo(T)-Primer hybridisieren am polyA⁺-Ende der mRNAs und besitzen am 3'-Ende zwei zusätzliche Nukleotide, die die Vielfalt amplifizierter mRNA einschränken.

Im darauffolgenden Schritt wird eine Polymerase Kettenreaktion mit der synthetisierten cDNA durchgeführt. Das 5'-Ende begrenzen wiederum die *anchored Primer*. Zusätzlich werden Gegenprimer bestehend aus Dekameren zugefügt, die eine beliebige Nukleotidsequenz aufweisen. Je mehr unterschiedliche Gegenprimer man verwendet, desto größer die Anzahl der Produkte („cDNA-Bibliothek“), so daß man meist eine Gruppe aus höchstens 20 Dekameren einsetzt. Abschließend zeigt eine Gelelektrophorese das Expressionsmuster, das bei der Verwendung der gewählten Bedingungen entsteht. Die Muster der einzelnen Zellpopulationen können nun miteinander verglichen werden.

Von Genen, deren Expression variiert, werden die cDNAs kloniert, d. h. in bakterielle Plasmidsysteme überführt, um eine weitere Charakterisierung zu ermöglichen. Nachteil des Differential Displays ist allerdings eine geringe Reproduzierbarkeit der Methode, bedingt durch die hohe Sensitivität und eine damit verbundene hohe Anfälligkeit für kleinste experimentelle Variationen. Dies macht es notwendig, Experimente mehrfach zu wiederholen (Lottspeich *et al.*, 1998).

RNA-Analyse durch Primerverlängerung

Primerverlängerung ist eine einfache Methode, die einen radioaktiv markierten spezifischen Primer verwendet, der in einem Gemisch aus mRNAs durch eine Reverse Transkriptase verlängert wird. Auf einer Gelelektrophorese mit anschließender Auflage eines Röntgenfilms ist die Anwesenheit des Produktes zu erkennen.

Die Methode kann genutzt werden, um eine semi-quantitative Bestimmung der Effektivität einer Transfektionsreaktion (Übertragung von DNA in Wirtszellen) durchzuführen.

6.3. Methoden basierend auf Sequenzanalyse

6.3.1. DNA-Mikroarrays

DNA-Mikroarrays können sowohl zur Sequenzierung von Nukleinsäuren als auch z. B. zur Genexpressionsanalytik dienen. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Herstellung und Verwendungsmöglichkeiten dieser neuartigen Technologie gewähren:

Die Übertragung von DNA (*Southern-Blot*) bzw. RNA (*Northern-Blot*) aus einer Gelmatrix auf einen festen Träger und die anschließende Hybridisierung markierter Sonden an die Nukleinsäuren war der erste Schritt in Richtung der Entwicklung eines *Arrays* (Southern, 1975). Durch die Verwendung nichtporöser Glaträger, Fluoreszenzdetektion und der Kombination neuer Methoden zur Aufbringung oder Synthese von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Dispenser- oder Plotterapparaturen, entwickelten sich Möglichkeiten zur Herstellung von hochdichten DNA-Arrays mit einer bis heute erreichten Dichte von 300.000 Oligonukleotiden (bis zu 25 bp) auf einer Fläche von 1.3x1.3 cm (Lipshutz *et al.*, 1999).

Die Fa. Affymetrix, einer der Vorreiter der Arrayentwicklung, benutzt einen photolithographischen Prozeß, mit dem es gelingt, hochgradig geordnete Oligonukleotid-Bibliotheken auf Glasoberflächen zu erzeugen (Patent: Pirrung *et al.*, 1990). Dabei wird die Oberfläche mit einer photochemisch aktivierbaren Schicht bedeckt. Über eine Photomaske, die die Belichtung bestimmter Regionen auf dem Chip zuläßt, werden die bestrahlten Bereiche durch die Abspaltung einer photolabilen Schutzgruppe aktiviert (Caviani Pease *et al.*, 1994 und McGall *et al.*, 1996). Vergleichbar der Phosphoramidit-Methode, die in Kap. II. 2.1.1.6. dargestellt wird, erfolgt die Kopplung des ersten Phosphoramidit-Bausteins an die „entschützte“ Hydroxylgruppe der Oberfläche. Auch das gekoppelte Phosphoramidit enthält eine photochemisch aktivierbare Gruppe, so daß durch gezielte Bestrahlung und Wiederholung des Kopplungsprozesses letztendlich zweidimensionale Oligonukleotid-Arrays der beschriebenen Dichte entstehen. Um die Dichte weiter zu erhöhen, wurden in einer Arbeit von Singh-Gasson *et al.* (1999) maskenlose optische Verfahren angewendet, die Oligonukleotidarrays von 76.000 Moleküle / 16 mm² erreichten.

Parallel zur Arrayentwicklung wurden die erzeugten strukturierten Oberflächen mit Hilfe von Methoden wie Atom-Kraftmikroskopie (AFM, Mazzola *et al.*, 1999), Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS, Herne *et al.*, 1997) oder elektrochemisch (Steel *et al.*, 1998) charakterisiert, um das Verhalten der Oligonukleotide auf einem Hochdichte-Array zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß die immobilisierten kurzen Oligonukleotide horizontal

auflagen, während Doppelstränge, gebildet nach der Hybridisierung, vertikal zur Festphase orientiert waren.

Die Variationsbreite der Anwendungsgebiete der Mikroarrays in der Nukleinsäureanalytik ist vielseitig, jedoch war die Motivation zur Herstellung innerhalb des *Humanen Genom Projektes* zu finden, einer weltweiten Anstrengung, das menschliche Genom zu sequenzieren und zu kartieren. Mit der Methode *sequencing by hybridization* (Cantor *et al.*, 1992 und Southern, 1996) sollte auf einem DNA-Array, der 8 bp lange Oligonukleotide mit 65536 ($=4^8$) verschiedenen Sequenzen enthielt, die Sequenzierung effektiver und schneller durchgeführt werden. Mittlerweile zeigt sich jedoch der Nutzen der Arraytechnologie vor allem in zwei anderen Bereichen der Nukleinsäureanalytik: In der *Genexpressionsanalytik* und *Mutationsdiagnostik*.

In der *Genexpressionsanalytik* werden z. B. die gesamten mRNAs einer Zelle mit Hilfe der RT-PCR vervielfältigt, wobei die Produkte (Amplifikate) mit fluoreszierenden Molekülen markiert sind. Die Produkte werden dann auf einem Oligonukleotid- bzw. cDNA-Array hybridisiert, die zu verschiedenen Genabschnitten komplementäre Sequenzen besitzen. Das Muster der Hybridisierung gibt Aufschluß über die Transkriptionsaktivität individueller Gene. Um nach bekannten Punktmutationen im Genom zu screenen, werden in der *Mutationsdiagnostik* Arrays eingesetzt, die neben der Zielsequenz („nicht-mutiert“) auch Oligonukleotidsequenzen enthalten, in denen einzelnen Basenpaare ausgetauscht sind („mutiert“). Das Hybridisierungsmuster ermöglicht die Erkennung mutierter Sequenzen durch die unterschiedlichen Effektivitäten der Hybridisierung.

II. Material

1.1. Chemikalien

γ -³²P- Adenosin-Triphosphat (ATP) : Amersham, Braunschweig

Agarose : Serva, Heidelberg

Aminopropyltriethoxysilan (APTS) : Aldrich, Steinheim

Ampicillin : Sigma, Deisenhofen

Avidin (aus Hühnereiweiß) : Fluka, Deisenhofen

Avidin (deglycosyliert) : Sigma, Deisenhofen

Biotinylamidohexanoic-acid-N-hydroxy-sulfo-succinimid-ester : Serva, Heidelberg

Bromphenolblau : Serva, Heidelberg

Chloroform : J.T. Baker, Groß Gerau

Chloroform-Phenol-Isoamylalkohol : Biometra, Göttingen

(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC): BIAcore, Freiburg

Ethylenediamintetraacetic acid (EDTA) : Riedel de Haën, Seelze

Ethidiumbromid (10 mg/ml) : Serva, Heidelberg

Ficoll 400 : Sigma, Deisenhofen

Formaldehyd : Merck, Darmstadt

Glutardialdehyd : Merck, Darmstadt

3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) : ABCR, Karlsruhe

HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure : Serva Heidelberg

Lithiumchlorid : Sigma, Deisenhofen

N-Hydroxysuccinimid (NHS) : Pierce, München

Phenol : Roth, Karlsruhe

Polyvinylpyrrolidon : Sigma, Deisenhofen

Rinderserumalbumin (BSA) : Sigma, Deisenhofen

Streptavidin : Sigma, Deisenhofen

SYBR GOLD : Molecular Probes, Leiden Niederlanden

Tween 20 : Pierce, München

1.2. Enzyme

Eco RI : Gibco BRL, Karlsruhe

Pst I (10000 U) : Stratagene, Heidelberg

T4 Polynukleotidkinase : New England Biolabs Inc., Schwalbach

1.3. Oligonukleotide und DNA

Die Oligonukleotide sind über Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen worden, mit Ausnahmen der 3'-Biotin modifizierten Proben, die von dem TIB Molbiol Labor (Berlin) synthetisiert wurden.

Name des Moleküls		Sequenz
Biotin RNA3	18-mer	5'-biotin-TGCGTTCTTGATCGATGC-3' (bzw. am 3'-Ende markiert)
Biotin RNA4	22-mer	5'-biotin-CGCTGCGTTCTTGATGCATGCG-3'
Biotin RNA5	25-mer	5'-biotin-AAACGCTGCGTTCTTGATGCATGCG-3'
Biotin 24-mer		5'-biotin-TGGGGGGGGGAATTCGGGGGGGGG-3'
Biotin OligoT	24-mer	5'-biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-5'
Biotin Forward pUC	18-mer	5'-biotin-GTTGTAAAACGACGGCCA-3'
Biotin LUC	24-mer	5'-AAAACCATCCTCTAGAGGATAGAA-3'
Comp8RNA	8-mer	5'-GCATCGAT-3'
Comp12RNA	12-mer	5'-GCATCGATCAAG-3'
CompRNA3	18-mer	5'-GCATCGATCAAGAACGCA-3'
Comp forward pUC	18-mer	5'-TGGCCGTCGTTTTACAAC-3'
RNA 2	14-mer	5'-CGTTCTTGATCGAT-3'
RNA 3	18-mer	5'-TGCGTTCTTGATCGATGC-3'
RNA 4	22-mer	5'-CGCTGCGTTCTTGATCGATGCG-3'
Forward pUC	18-mer	5'-GTTGTAAAACGACGGCCA-3'
Reverse pUC	20-mer	5'-AGCGGATAACAATTTCACAC-3'
8- mer		5'-CCCCCCCC-3'
16-mer		5'-CCCCCCCCCGAATTCC-3'
Probe22-mer		5'-CCGATCCGATCCGATCCGATCC-3'
28-mer		5'-CCCCCCCCCGAATCCCCCCCCCCCCCCC-3'
40-mer		5'-CCCCCCCCCGAATCCCCCCCCC(A) ₁₆ -3'

Desweiteren wurden Herings-Sperma-DNA (Sigma) und drei Längenstandards für die Gelelektrophorese benutzt :

Ampli Size-Ladder 50-2000 bp : BioRad, München

DNA-Ladder 100-1500 bp : Gibco BRL, Karlsruhe

RNA-Ladder 0.24-9.5 kbp : Gibco BRL, Karlsruhe

1.4. Puffer, Medien und Lösungen

PBS :

80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$

150 mM NaCl

pH 7.6

RNA-Isolation

LETS-Puffer :

100 mM LiCl

10 mM EDTA

10 mM Tris-HCl, pH 7.4

0.2 % Lithiumdodecylsulfat

Gelelektrophorese

10 x TAE (Trisacetat-Puffer) :

0.4 M Tris-HCL

10 mM EDTA

14 ml/l Eisessig

10 x TBE :

890 mM Tris-(hydroxymethyl)methylamin (TRISMA BASE)

890 mM Borsäure

50 mM EDTA

auf pH 8.0 mit NaOH einstellen.

20 x SSC :

3 M NaCl

300 mM Natriumcitrat

pH 7.0

10 x FA :

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

NaOH bis pH 7.0

1 x FA-Laufpuffer :

100 ml 10 x FA-Puffer
20 ml Formaldehyd (37 %ig)
880 ml RNase freies Wasser

5 x RNA-Gelauftragspuffer :

16 µl Bromphenolblau-Lösung
80 µl EDTA-Lösung (0.5 M, pH 8.0)
720 µl Formaldehyd (37 %ig)
2 ml Glycerin
3084 µl Formamid
4 ml 10 x FA-Puffer

DNA-Gelauftragspuffer :

30 % Glycerin
30 mM EDTA
0.03 % Bromphenolblau
0.25 % Xylencyanol

DNA-Gelfärbelösung :

10 µl SYBR Gold-Lösung
100 ml 1 x TAE bzw. TBE-Puffer

RNA-Formaldehyd-Agarosegel (1.5 %ig) :

1.5 g Agarose
10 ml 10 x FA-Puffer
1.8 ml Formaldehyd (37 %ig)
1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
auf 100 ml auffüllen.

DNA-Agarosegel (1.5 %ig) :

1.5 g Agarose
100 ml 1 x TAE bzw. TBE-Puffer

Northern-Blots100 x Denhardt's Lösung :

2 % Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)
2 % Ficoll 400
2 % Polyvinylpyrrolidon

Prehybridisierungspuffer :

15 ml 6 x SSC
2.5 ml Denhardt's Lösung
2.5 ml 10 % SDS-Lösung
250 µl DNA aus Hering, 2 min auf 95°C

MedienLB (Luria-Bertani) Medium :

10 g Bacto-trypton
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g NaCl
1 ml NaOH, 1 M
950 ml dest. H₂O, pH 7.5

Plasmidisolation

NucleobondTM-Kit zur Plasmidisolation : Clontech, Heidelberg

Polymerase Kettenreaktion

GeneAmp[®]-Kit : Perkin-Elmer, Norwalk, USA

TaKaRa[®]-Amplifikation-Kit : Boehringer-Ingelheim, Heidelberg

1.5. Geräte und MaterialienGitterkoppler

Gitterkoppler System GCS-1 : ASI, Zürich, Schweiz

Gitterkopplerchips ASI 3200 : ASI, Zürich, Schweiz

3/2 Wege Ventil LFAA : Lee Co., Westbrook, USA

Gilson Pumpe Miniplus : Abimed, Langenfeld

Teflonschlauch 0.5-0.8 mm : Omnifit Ltd. Cambridge, Großbritannien

Pumpschlauch : Ismatec, Weilheim

Atom-Kraftmikroskop

Nano ScopeTM : Digital Instruments, Santa Barbara, USA

Nano ScopeTM IIIa System Controller : Digital Instruments, Santa Barbara, USA

Spitzen : Digital Instruments, Santa Barbara, USA

Nukleinsäureaufreinigung

Brown Shaker : Linde, Wiesbaden

EASY RH3- Geldokumentationsapparatur : Herolab, Wiesloch

Filmkassette : Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA

Glasbeads Ø 0.5 mm : Sigma, Deisenhofen

Hybond-N-Blotmembran : Amersham, Freiburg

Hybridisierungssofen Hybridizer 600 : Stratagene, Heidelberg

Membranfilter „V“, 0.025 μm : Millipore, Bedford, USA

NAPTM-5-Säulen : Pharmacia, Freiburg

Stratalinker : Stratagene, Heidelberg

Gelkammer : BioRad, München

Magnetbeads Biomag, Paesel & Lorei GmbH, Frankfurt/Main

Polymerase Kettenreaktion

Reaktionsgefäße : Eppendorf, Hamburg u. BioZym, Hamburg

Thermocycler : Landgraf, Hannover-Langenhagen

Gradientencycler TGradient : Biometra, Göttingen

Sonstige

Photometer Ultrospec 3000 : Pharmacia, Freiburg

Tischzentrifuge Biofuge fresco : Heraeus, Hanau

Zentrifuge 5415 C : Eppendorf, Hamburg

Gene Assembler : Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.1. Optische Affinitätssensoren

2.1.1. Gitterkoppler

2.1.1.1. Grundlagen

Planare Lichtwellenleiter, die aus einem Glassubstrat und einer dünnen lichtleitenden Beschichtung bestehen, können effektiv für die Untersuchung von Oberflächen- oder Grenzflächenphänomenen eingesetzt werden. Die Lichtleiter reagieren auf submonomolekulare Schichtdickenänderung durch die Anlagerung von Molekülen durch Physisorption bzw. Chemisorption, die dadurch eine Änderung des effektiven Brechungsindex induzieren. Durch Messung dieser Änderung werden sie für die Verwendung als Transducerkomponente eines (bio-)chemischen Sensors nutzbar (Tiefenthaler, 1992).

Die Grundlage der Gitterkoppler ist das physikalische Prinzip der Totalreflexion von Licht an Grenzflächen zwischen Medien unterschiedlicher optischer Dichte. Totalreflexion tritt dann auf, wenn Licht von einem optisch dichteren (Lichtwellenleiter) in ein optisch dünneres

Medium (hier : Luft bzw. Pufferlösung) übergeht. Wird der Einkoppelwinkel entsprechend gewählt, erfolgt der Weitertransport des eingestrahnten Lichts im Wellenleiter. Über ein in die Glassubstratstruktur des Gitterkoppler-Chips eingeprägtes Gitter wird Laserlicht über Beugung in eine Lichtwellenleiterschicht eingekoppelt. Als Wellenleiterschicht dient z. B. eine Ta_2O_5 -Schicht, die sehr dünn auf das Glassubstrat aufgesputtert wurde. Abbildung 2.1. zeigt schematisch die Einkopplung des Lichts, das mit der Intensität I auf das Gitter trifft und dort gebeugt wird. Besitzt das Laserlicht den für die Totalreflexion notwendigen günstigen Einkoppelwinkel, verbleibt Licht der Intensität I' im Wellenleiter, wo es am Ausgang des Sensorchips auf einen Photodetektor trifft und dort vermessen wird.

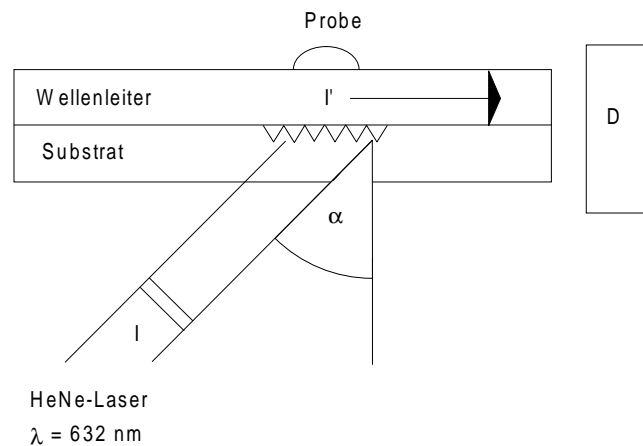


Abb. 2.1. : Schematische Darstellung der Lichteinkopplung in Lichtwellenleiter: Licht der Intensität I fällt von der Unterseite des Chips auf ein Beugungsgitter, das Strahlung in den Wellenleiter (z. B. Ta_2O_5) eingekoppelt. Die geführte Lichtintensität I' wird am Detektor in Abhängigkeit des Einkoppelwinkels α vermessen.

Während eines Meßzyklus wird der Einstrahlwinkel α des Laserlichts variiert, indem sich der Sensorchip, der integriert auf einem drehbaren Meßtisch vorliegt, in einem bestimmten Winkelspektrum $\Delta\alpha$ bewegt. Damit verändert man gleichzeitig die Effektivität der Lichteinkopplung, die als I' am Ausgang vermessen wird. Als Meßwert wird jeweils der Einkoppelwinkel aufgezeichnet, an dem die eingekoppelte Lichtintensität am größten ist. Die Einkoppelbedingung gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen dem effektiven Brechungsindex N_{eff} der Wellenleiterschicht und dem Einkoppelwinkel α wieder :

$$N_{\text{eff}} = n_0 \sin\alpha + m\lambda/\Lambda \quad (3)$$

mit n_0 = Brechungsindex des umgebenen Mediums
 m = Beugungsordnung
 λ = Wellenlänge des eingestrahnten Lichts
 Λ = Gitterkonstante

Durch Erfassung des optimalen Einkoppelwinkels kann der effektive Brechungsindex leicht berechnet werden, der von den Eigenschaften des Lichtwellenleiters und dem eingestrahlt Licht abhängig ist: Dicke des Wellenleiters d_F , die Brechungsindices des Substrates n_S , des Lichtleiters n_F und der Umgebung n_C determinieren die Eigenschaften ebenso wie die Wellenlänge λ , die Modenanzahl m , sowie deren Polarisierung (transversal elektrisch TE und transversal magnetisch TM).

Hohe Sensitivitäten werden mit solchen Systemen erreicht, bei denen die Dicke der Lichtleiterschicht sehr dünn ist (100-200 nm) und der Brechungsindexunterschied zwischen n_F und $n_S \geq 0.2$ liegt (Tiefenthaler, 1992).

Lukosz und Tiefenthaler (1992) haben die Lichtleitung in einem planaren Wellenleiter, der aus drei Schichten besteht (Substrat, Wellenleiter und Umgebung), mathematisch mit der Modengleichung beschrieben :

$$\Phi \equiv 4\pi d_F / \lambda (n_F^2 - N_{\text{eff}}^2)^{1/2} + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,C} = 2\pi m \quad (4)$$

mit Φ = Phasenverschiebung der geführten Mode

d_F = Dicke der Wellenleiterschicht

$\Phi_{F,S}$ = Phasenverschiebung an der Grenzfläche zwischen Wellenleiter und Substrat

$\Phi_{F,C}$ = Phasenverschiebung an der Grenzfläche zwischen Wellenleiter und Umgebung

Aus der Gleichung (4) wird deutlich, daß es trotz totalreflektierter Lichtwelle zu Wechselwirkungen an den Phasengrenzen kommt, so daß wie oben erwähnt der Brechungsindex an der Oberfläche des Sensorchips den gemessenen effektiven Brechungsindex beeinflusst. Diese Wechselwirkung ist von entscheidender Bedeutung, denn sie ermöglicht die Nutzung des Gitterkoppleraufbaus als Sensorsystem, das empfindlich auf Veränderung an der Lichtwellenleiteroberfläche reagieren kann.

Ist der Chip mit einer wässrigen Probe bedeckt, kann man durch Veränderung der Probenzusammensetzung (z. B. Variation der Salzkonzentration) hochempfindlich Einfluß auf den effektiven Brechungsindex nehmen. Neben der reinen Variation der Probenzusammensetzung kann es zu einer Anlagerung von (Bio-)Molekülen auf die Oberfläche kommen, die N_{eff} ebenso meßbar verändert.

Mit der Ausbreitung der Mode im Wellenleiter ist ein elektromagnetisches Feld verbunden, das nach Ableitung aus der Modengleichung nicht an der Grenzfläche zur Umgebung verschwindet, sondern als *evaneszentes*, d. h. exponentiell abklingendes Feld in die Probe

hineinreicht. Das evaneszente Feld, das durch Totalreflexion an Grenzflächen entsteht (Gest *et al.*, 1991), zeigt eine Eindringtiefe Δz , die abhängig ist von :

$$\Delta z = (\lambda/2\pi) (N_{\text{eff}}^2 - n_c^2)^{-1/2} \quad (5)$$

Abbildung 2.2. zeigt schematisiert die Adsorption von Proteinmolekülen auf einem Sensorchip und die Wechselwirkungen des geführten elektromagnetischen Feldes:

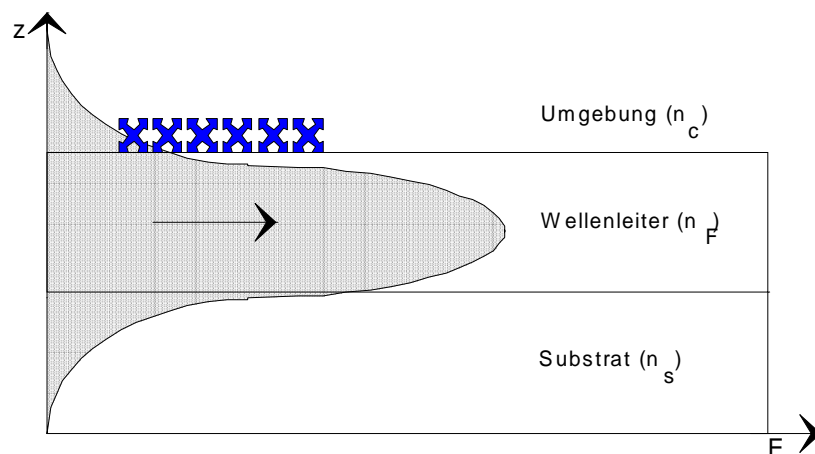


Abb. 2.2. : Schematische Darstellung der Feldverteilung einer geführten Welle in einem Lichtwellenleiter. Die Brechungsindizes der verschiedenen Medien sind: n_c : Umgebung, n_s : Substrat und n_F : Wellenleiter, wobei E der Feldstärke entspricht. Durch Anlagerung der Proteinmoleküle ändert sich der Brechungsindex n_c der Umgebung, der das evaneszente Feld der geführten Welle beeinflusst. Daraus resultiert eine meßbare Änderung des effektiven Brechungsindex N_{eff} .

Bei Verwendung eines Helium-Neon-Lasers ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) und Wasser als Bedeckung berechnet sich die Eindringtiefe des Feldes auf ca. 88 nm (Polzius *et al.*, 1996). Immobilisierte Proteine oder Nukleinsäuren, die zur Beobachtung von Affinitätsreaktionen verwendet werden sollen, befinden sich in einem mittleren Abstand von 3 - 10 nm zur Oberfläche, in einem Bereich also, in dem das evaneszente Feld die größte Feldstärke besitzt. Für die meisten sensorischen Anwendungen wird daher aufgrund der geringen Größe der Biomoleküle lediglich ein kleiner Teil des elektromagnetischen Feldes genutzt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß durch die geführte Lichtwelle ein *elektromagnetisches evaneszentes Feld* entsteht, das in die Probenlösung hineinreicht. Kommt es zur Anlagerung von Molekülen auf der Oberfläche, wechselwirken diese mit dem Feld und bewirken eine Verschiebung der primären Meßgröße des Einkoppelwinkels α . Diese korreliert mit der

Veränderung auf der Oberfläche und ermöglicht daher die experimentelle Verfolgung von Affinitätsreaktionen.

2.1.1.2. Meßaufbau des ASI Gitterkopplers “GCS-1”

Das erläuterte Meßprinzip wurde in einem Gerät der Firma ASI, Zürich verwirklicht, wobei der Chip auf einem drehbaren Meßtisch liegt. Die eingekoppelte Lichtintensität wird mit 2 Photodioden an den Ausgängen der Lichtwellenleiter vermessen (Abb. 2.3.). Der Chip wird während der Messung von einem Helium-Neon Laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) bestrahlt. Der Einstrahlwinkel wird variiert, indem ein Schrittmotor die Position des Meßtisches periodisch verändert. Die Photodioden vermessen das Intensitätsprofil des eingekoppelten Lichtes in Abhängigkeit des Winkels. Essentiell für die Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Winkelmessung ist die Mechanik des Systems.

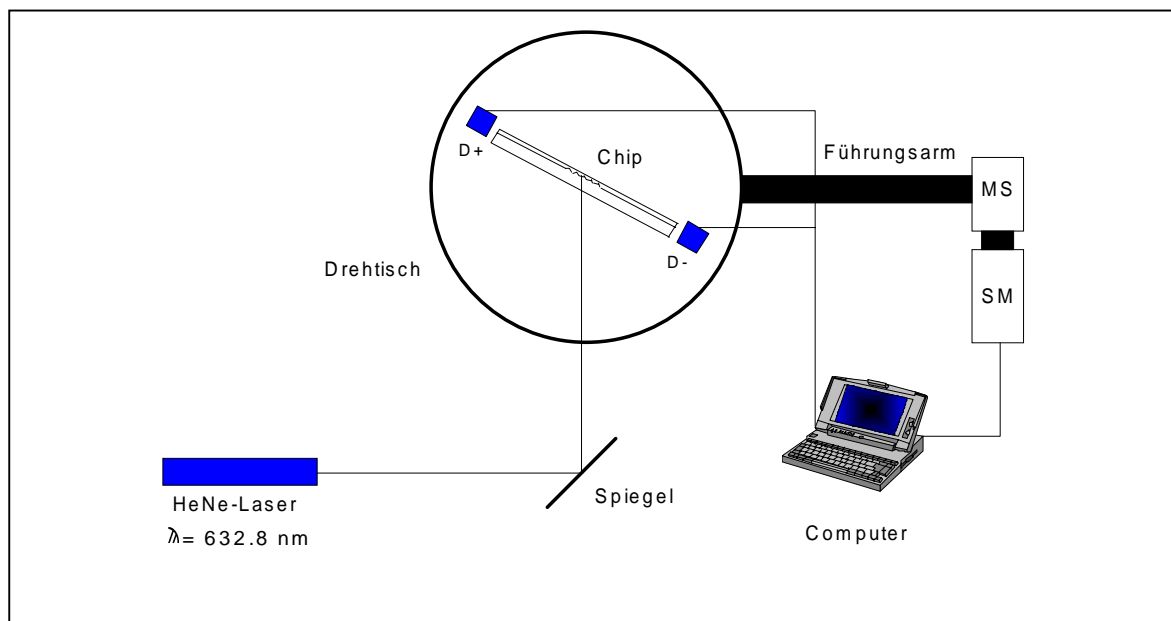


Abb. 2.3. : Schema des Gitterkopplers GCS-1 der Firma ASI, Zürich, Schweiz. Ein Helium-Neon-Laser strahlt Licht über einen Umlenkspiegel auf den Lichtwellenleiter, der auf einem beweglichen Drehtisch befestigt ist. Die austretende Lichtintensität wird durch die Detektoren D_+ und D_- vermessen. Ein Computer steuert die Drehbewegung des Meßtisches, der über einen Führungsarm mit einer Mikrometerschraube (MS) und einem Schrittmotor (SM) verbunden ist.

Aus dem experimentellen Wert für eine minimal meßbare Brechungsindexänderung von $\Delta n_{\min} = 1 \cdot 10^{-6}$ errechnet sich mit Gleichung (3) eine Winkelpräzision von $2.4 \cdot 10^{-4}^\circ$, wobei die Scanraten bei 2.9 s liegen.

Die Steuerung des Schrittmotors sowie die Aufzeichnung der Meßdaten erfolgt mit Hilfe eines Computers und ASI-Software. Aus der primären Meßgröße des optimalen

Einkoppelwinkels kann nach Gleichung (3) der effektive Brechungsindex N_{eff} und nach Gleichung (4) die Schichtdicke d_F der gebundenen Moleküllschicht bestimmt werden.

Neben dem in dieser Arbeit verwendeten Einkoppelmodus des Gitterkopplers gibt es eine zweite Variante nach Brandenburg (1993), die im Reflexionsmodus mißt. Der Vorteil dieser Apparatur, die die Reflexion am Gitter in einem Winkelspektrum erfaßt, liegt in dem Fehlen beweglicher Teile. Erfolgt optimale Einkopplung, so wird im Winkelspektrum ein Minimum beobachtbar, dessen Position ausgewertet wird.

2.1.1.3. Verwendete Lichtwellenleiter

Die verwendeten Lichtwellenleiter, hergestellt von der Fa. Balzers, Lichtenstein, bestanden aus einem Glaträger (Substrat AF 45 der Fa. Schott), die mit einer dünnen Ta_2O_5 -Schicht besputtert war. Die Gitterstruktur ist auf das Glassubstrat in einem Heißprägeverfahren aufgestempelt worden:

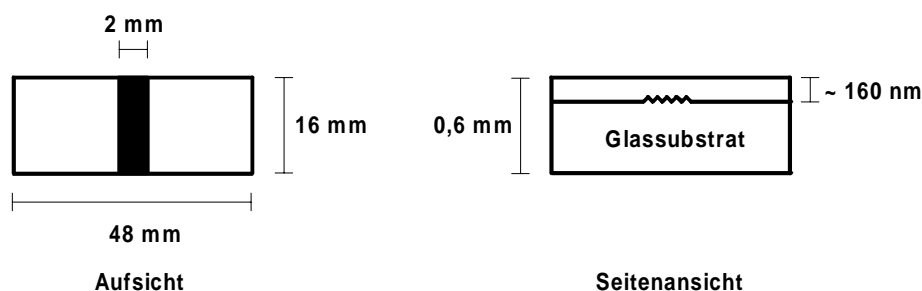


Abb. 2.4. : Abmessungen des Lichtwellenleiters ASI 3200.

ASI 3200

Material Lichtwellenleiter	: Ta_2O_5
Brechungsindex (Ta_2O_5)	: 2.22
Material Substrat	: Borsilikatglas
Brechungsindex Substrat	: 1.5313
Dicke Wellenleiter	: ca. 160 nm *
Gitterkonstante	: 0.75 μm
gemessene Moden	: TM

* die Messungen zur Schichtdicke wurden durchgeführt von Dipl. Chem. Martin Herold, Universität Tübingen.

2.1.1.4. Aufbau des Fließsystems beim Gitterkoppler

Die Integration der Lichtwellenleiter in ein Fließsystem erfolgte über eine Durchflußzelle, deren Volumen in Abhängigkeit des Anpreßdrucks ca. 15 mm³ betrug. Eine Pumpe saugte Flüssigkeit über den Sensorchip, während über zwei 3/2-Wege Magnetventile zwischen Probe-, Carrier- und Regenerierungslösung gewechselt werden konnte. Abbildung 2.5. zeigt den prinzipiellen Aufbau des Fließsystems :

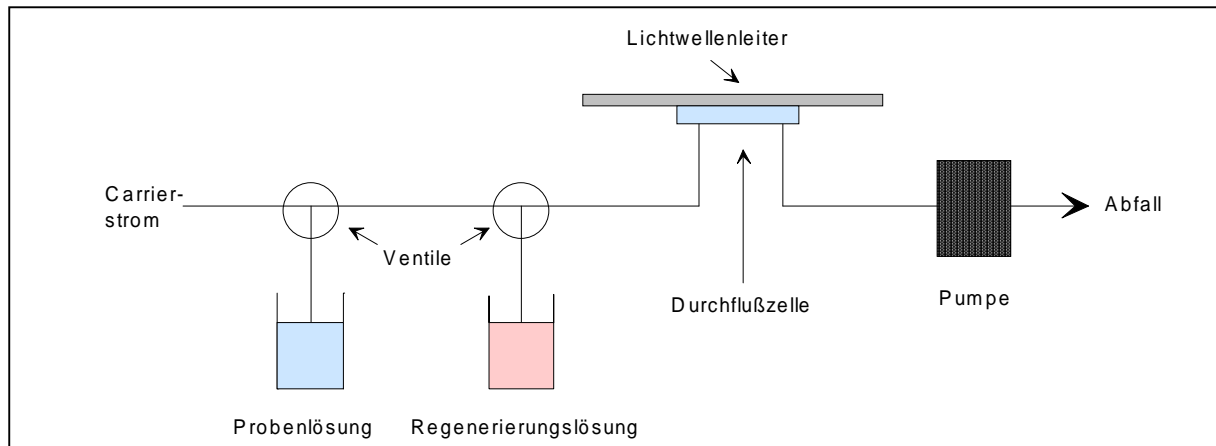


Abb. 2.5. : Aufbau des Fließsystems am Gitterkoppler ASI GCS-1.

Allgemeiner Meßablauf am Gitterkoppler :

Nach dem Einbau der Lichtwellenleiter wurde das Fließsysteme für 5-10 min mit entgastem Carrierpuffer gespült, so daß keine Luftblasen in der Fließzelle vorhanden waren. Anschließend erfolgte die Meßwertaufnahme i. d. R. bei einer Fließrate von 100 µl/min nach folgendem Schema (abweichende Fließraten sind angezeigt) :

- Spülen mit Carrierpuffer zur Aufnahme der Grundlinie (5 – 10 min).
- Avidinbeladung durch Ansaugen einer Lösung mit 250 µl Volumen (z. B. 25 µg Protein).
- Inkubation der Proteinlösung für 5 - 30 min (Fließrate = 0).
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Carrierpuffer für 15 – 60 min bis zum Erreichen einer stabilen Grundlinie.
- Beladung (100 µl Volumen) und Inkubation der Sonde für 5 – 30 min.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems zur Entfernung unspezifisch gebundener biotinylierter Sonde für 5 – 30 min.
- Ansaugen der Proben- bzw. Standardlösungen (Fließrate = 100 µl/min) und Inkubation zur Hybridisierung in der Küvette (Fließrate = 0) für 5 – 30 min.

- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Carrierpuffer für 2 – 5 min bis zum Erreichen einer stabilen Grundlinie.
- Regenerierung der Sensoroberfläche durch 2 min Spülen mit 50 mM NaOH (Fließrate = 100 – 1800 $\mu\text{l/min}$)
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Carrierpuffer für 15 – 60 min bis zum Erreichen einer stabilen Grundlinie, um den Sensorchip für eine erneute Probenaufnahme bereitzustellen.

Ablauf eines Meßzyklus mit direktgekoppelten Chips

Nach Integration des Lichtwellenleiters in den optischen Detektor wurde mit entgastem Puffer gespült, um alle Luftblasen aus dem System zu entfernen. Eine anschließende Messung verliefen bei RT und einer Fließrate von ca. 100 $\mu\text{l/min}$ nach folgendem Schema :

- Spülen mit Carrierpuffer zur Aufnahme einer Grundlinie (5 – 10 min).
- Ansaugen von 250 μl Probe- bzw. Standardlösung (Fließrate = 100 $\mu\text{l/min}$) und Inkubation zur Hybridisierung in der Küvette (Fließrate = 0) für 5 – 30 min.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Carrierpuffer für 2 – 5 min bis zum Erreichen einer stabilen Grundlinie.
- Regenerierung der Sensoroberfläche durch 1-2 min Spülen mit 50 mM NaOH (Fließrate = 100 – 1800 $\mu\text{l/min}$)

2.1.1.5. Oberflächenmodifikationen der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter

2.1.1.5.1. Vorbehandlung und Regenerierung der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter

Benutzte Lichtwellenleiter wurden für 30-60 s in einer Mischung aus konz. H₂SO₄ / H₂O₂ (70:30) eingetaucht, gründlich mit dest. H₂O gespült und anschließend getrocknet.

2.1.1.5.2. Silanisierungsreaktionen für Ta₂O₅-Lichtwellenleiter

Silanisierungsreaktionen werden in der Biosensorik häufig angewendet, um Oberflächen chemisch zu modifizieren (Polzius *et al.*, 1996). Ziel der Oberflächenbehandlung mit einem Silan kann sein, eine inerte Fläche zu erhalten, um unspezifische Wechselwirkungen eines Probenbestandteiles zu unterbinden (Shoffner *et al.*, 1996). Hauptsächlich jedoch werden

durch die Silanisierung kopplungsfähige Gruppen auf den Träger aufgebracht, um Moleküle zu immobilisieren.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Silane, Aminopropyltriethoxysilan (APTS) und 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS), wurden benutzt, um kopplungsfähige Amino- bzw. Epoxygruppen zu erzeugen. Abbildung 2.6. schematisiert eine postulierte Bindungsreaktion der Verbindungen mit der Sensoroberfläche :

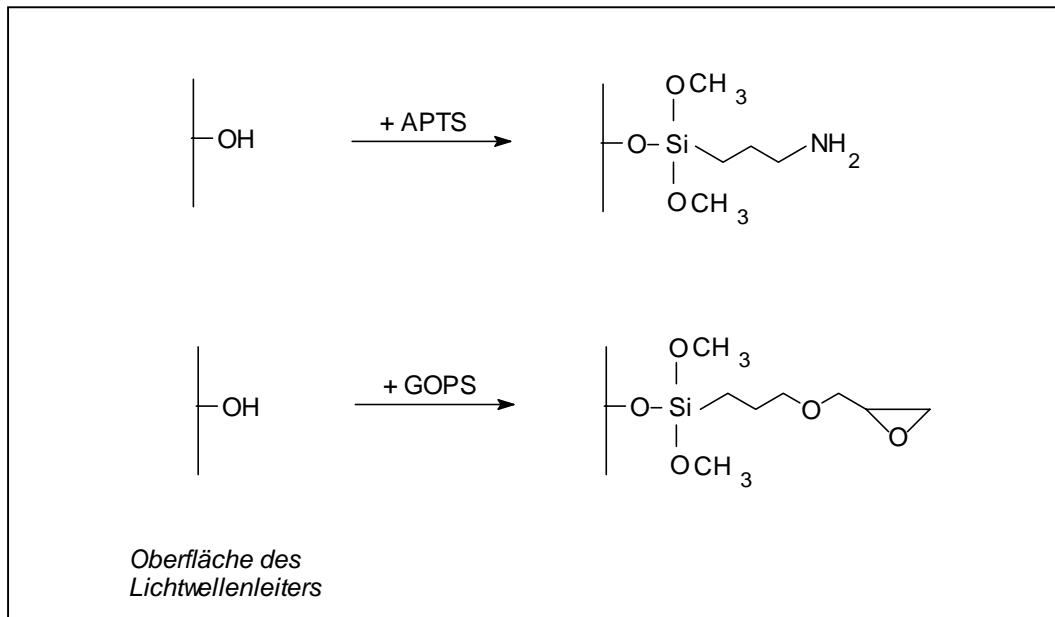


Abb. 2.6. : Silanisierungsreaktionen der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter. Oben gezeigt ist die Verwendung von APTS, unten dargestellt ist GOPS. Zu beachten ist, daß es sich bei dem gezeigten Schema nur um einen möglichen Reaktionsverlauf handelt, der in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen variiert (s. dazu Vandenberg et al., 1991).

Silanisierung mit APTS

In der Arbeit wurde sowohl eine wäßrige Silanisierung (nach: Weetall, 1976), als auch eine Behandlung in Aceton durchgeführt (nach: Polzius, 1995):

- Die Sensorchips wurden 1 h bei RT in einer 5%igen APTS-Lösung in Aceton inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche gründlich mit Aceton gespült und für ca. 2 h bei 120°C getrocknet.
- Die Sensorchips wurden für 2 h bei 80 °C in einer 10%igen APTS-Lösung in dest. H₂O (pH 3.5, mit HCl eingestellt) inkubiert. Anschließend wurde mit dest. H₂O gründlich gespült und für ca. 2 h bei 120°C getrocknet.

Silanisierung mit GOPS

Die Sensorchips wurden bei 140°C im Dampf einer 5%igen GOPS-Lösung in trockenem Toluol ü. N. inkubiert. Vor der eigentlichen Reaktion wurde das System entgast und mit trockenem N₂ gespült. Der apparative Aufbau bestand aus einem Dreihalskolben, indem die Chips mit Hilfe einer Teflonhülse eingehängt wurden und einem Rückflußkühler samt CaCl₂-Trockenrohr, in dem die Chips mit Hilfe einer Teflonhülse eingehängt wurden. Nach erfolgter Silanisierung wurden die Chips mit Toluol und Methanol gespült und bei 80°C getrocknet (nach: Polzius, 1995 und Locascio-Brown *et al.*, 1990).

2.1.1.5.3. Immobilisierungsreaktionen

Zur Immobilisierung von Avidin bzw. Streptavidin wurden neben der rein adsorptiven Anlagerung die kovalente Kopplung über Glutardialdehyd und BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl)Suberat), bzw. die Affinitätsbindung über Biotinmoleküle verwendet.

A. Immobilisierung über adsorptive Bindung

Die adsorptive Bindung (*Physisorption*) ist die einfachste Methode zur Immobilisierung eines Rezeptors (Liganden-bindendes Moleküle) an eine Oberfläche. Gewicht hat sie in der Bioanalytik im Besonderen auf dem Gebiet der Mikrotiterplatten-Test (z. B. zur Bindung von Antikörpern oder Avidin) oder bei Teststreifen, bei denen eine Regenerierung der immobilisierten Komponente nicht angestrebt wird.

Die Art der Wechselwirkungen können sehr vielschichtig sein und sind häufig nicht eindeutig definiert. So können hydrophobe wie polare Wechselwirkungen nebeneinander auftreten und die Adsorption des Moleküls bewirken. Die beobachteten Werte für die Enthalpien der Physisorption liegen meist bei $\Delta H_{ad} = -20$ kJ/mol (Atkins, 1996).

Adsorptive Bindung von Avidin bzw. Streptavidin an Lichtwellenleiter

- Silanisierte oder rohe Ta₂O₅-Lichtwellenleiter, die integriert im Gitterkoppler vorlagen, wurden mit 250 µl Proteinlösung der Konzentration 100 µg/ml in 80 mM PBS, pH 7.6 überströmt. Erreichte die Lösung die Oberfläche, wurde der Fluß für 10-30 min abgestoppt, um eine effektive Anlagerung zu erhalten. Anschließend wurde für 15 – 60 min bis zum Erreichen einer Grundlinie mit PBS gespült.

B. Immobilisierung über kovalente Bindung

Durch die Ausbildung einer *kovalenten Bindung* zwischen der Oberfläche und dem Rezeptor kommt es zu einer stabilen Immobilisierung, wobei geeignete kopplungsfähige Gruppen (z. B. Amino- bzw. Carboxylfunktionen) vorhanden sein müssen. Mittlerweile gibt es ein großes Repertoire an verschiedenen Kopplungsreagenzien und Methoden, die funktionelle Gruppen der Reaktionspartner miteinander verbrücken (Hermanson *et al.*, 1992). Nachteilig kann sich jedoch der Einfluß der Kopplungsreaktion auf das immobilisierte Molekül auswirken: Immobilisierte DNA zeigte im Vergleich zu homogenen Reaktionen generell eine veränderte Hybridisierungskinetik (Bryan *et al.*, 1986), die ebenso von der Länge und chemischen Zusammensetzung des Kopplungsreagenz abhängt (Maskos *et al.*, 1992).

Kopplung über Glutardialdehyd

Bei funktionellen *Aminogruppen* auf der Sensoroberfläche:

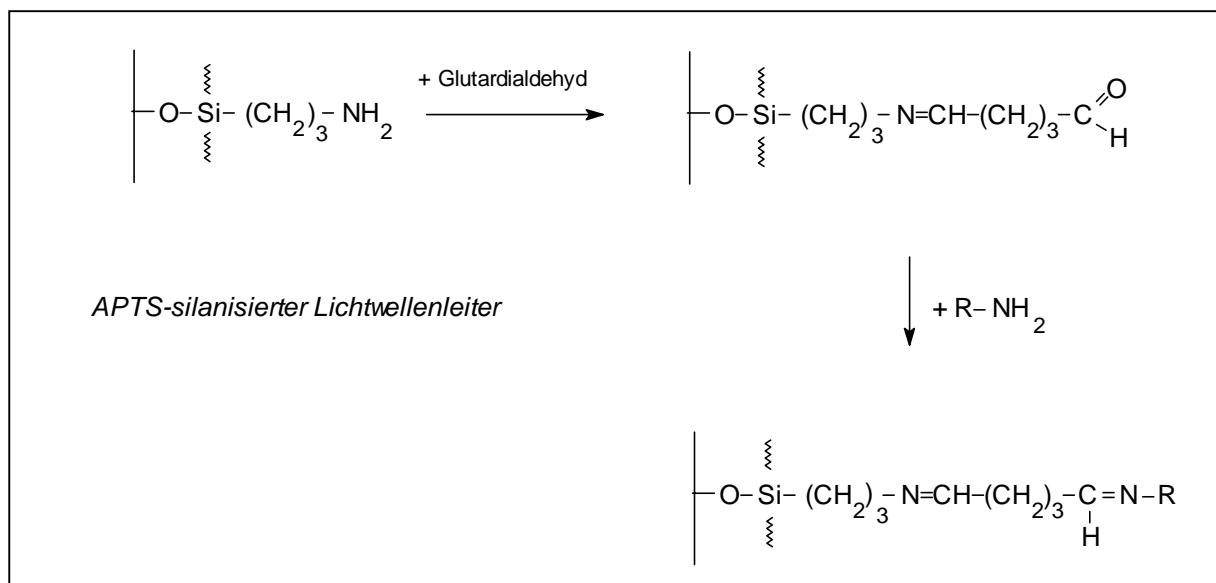


Abb. 2.7. : Kopplung von Proteinen über Glutardialdehyd.

- APTS-silanisierte Oberflächen wurden für 30-60 min mit einer 2.5%igen Glutardialdehyd-lösung in 80 mM PBS, pH 7.6 inkubiert. Anschließend wurde mit dest. H₂O gespült und für 1 h mit kopplungsfähigem Molekül (Protein oder Amino-modifizierte Nukleinsäure in 80 mM PBS) inkubiert. Die Schiff'schen Basen konnten durch Zugabe einer Natriumborhydridlösung (10 mg/ml) in 0.1 mM NaOH reduziert werden (Weetall, 1976 und Hermanson *et al.*, 1992).

Kopplung über BS³

Bei funktionellen *Aminogruppen* auf der Sensoroberfläche:

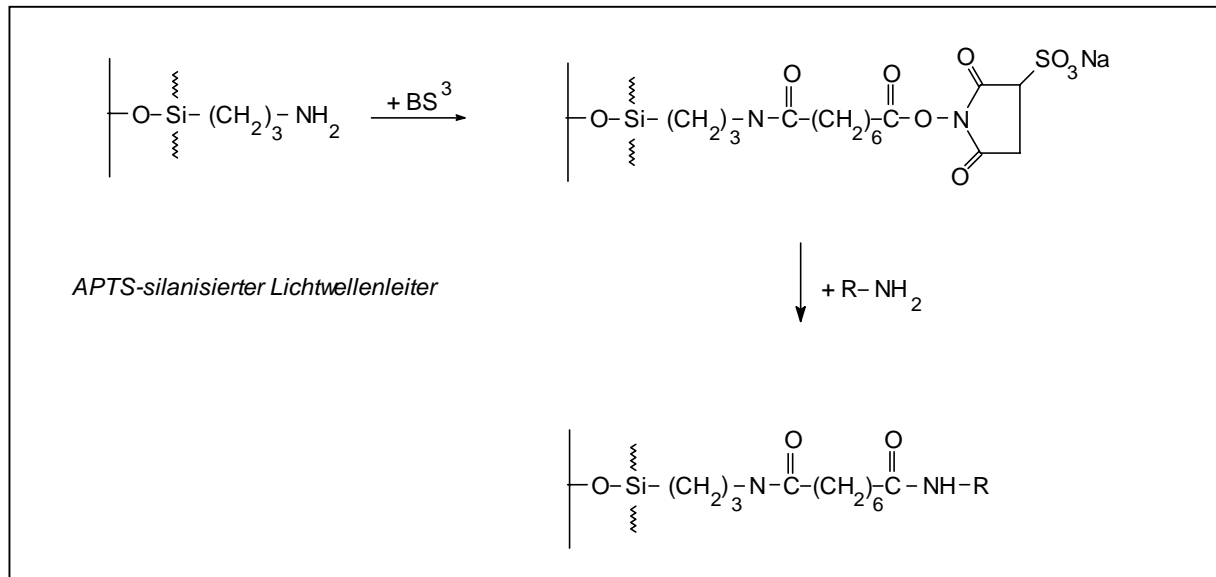


Abb. 2.8. : Kopplung von Proteinen über BS³.

- APTS-silanisierte Lichtwellenleiter wurden für 1 h in einer 20 mM BS³ (Bis(Sulfosuccinimidyl)Suberat)- Lösung in 80 mM PBS, pH 7.6 aktiviert. Nach Spülen mit dest H₂O wurde das Protein in einer Konzentration von 100 µg/ml (80 mM PBS, pH 7.6) für 1 h auf dem Sensor inkubiert (Partis *et al.*, 1983). Als Reaktionsraum diente dazu die Gitterkopplerfließzelle .

C. Immobilisierung über ionische Bindung

Die *ionische Bindung* eignet sich zur Immobilisierung von Molekülen z. B., wenn der Netzlading eines Rezeptorproteins durch die Verwendung geeigneter Pufferlösung so verändert werden kann, daß eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen auf der Oberfläche und dem Protein möglich wird.

In dieser Arbeit wurden Nukleinsäuremoleküle über die verbrückenden Phosphatgruppen an positiv geladene Sensoroberflächen gebunden. Dazu eignete sich insbesondere die APTS-silanisierte Oberfläche, da hier Aminofunktionen zur Verfügung standen.

Immobilisierung über ionische Bindung

APTS-silanisierte Lichtwellenleiter wurden in das Gitterkoppler-System eingebaut und mit einer Lösung aus 250 µg/ml Herings-Sperma-DNA in KPP (pH 6) überströmt. Erreichte die

Lösung die Oberfläche, wurde der Fluß für 10-30 min abgestoppt, um eine effektive Anlagerung zu erhalten.

D. Immobilisierung über Affinitätsreaktionen

Die Immobilisierungsmethode beruht auf der spezifischen und selektiven Interaktion zweier Bindungspartner, die miteinander in Wechselwirkung treten. Dabei wird ein Partner, der *Rezeptor*, adsorptiv oder kovalent auf die Sensoroberfläche immobilisiert, während der *Ligand* anschließend in häufig orientierter Ausrichtung gebunden wird. Beispiele für Affinitätspaare, die Anwendung in der Bioanalytik finden, sind das Protein A bzw. G aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus*, die spezifisch den F_C-Anteil von Antikörpern binden (Cruss, 1986 und Hermanson *et al.*, 1992).

Von allgemeiner Bedeutung für die Entwicklung der Affinitätsimmobilisierung ist das Biotin-Avidin-System (Wilchek *et al.*, 1990), das aufgrund der effektiven Bindung ($K_D \sim 10^{15}$, Green, 1990) zu den stärksten natürlich vorkommenden Bindungspaares gehört. Sowohl das Avidin aus Hühnereiweiß, als auch das verwandte Streptavidin aus *Streptococcus avidinii*-Bakterien besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin (Vitamin H). Zur Kopplung der Liganden, z. B. Nukleinsäuren oder Proteine, werden diese *biotinyliert*, d. h. über einen Spacer mit dem zu bindenden Liganden verknüpft. Biotin-Avidin-Wechselwirkungen sind aufgrund der hohen Bindungskonstante nicht regenerierbar, so daß sie für schnelle und feste Bindung von biotinylierten Sonden in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Kopplung über Biotingruppen

Bei funktionellen *Aminogruppen* auf der Sensoroberfläche:

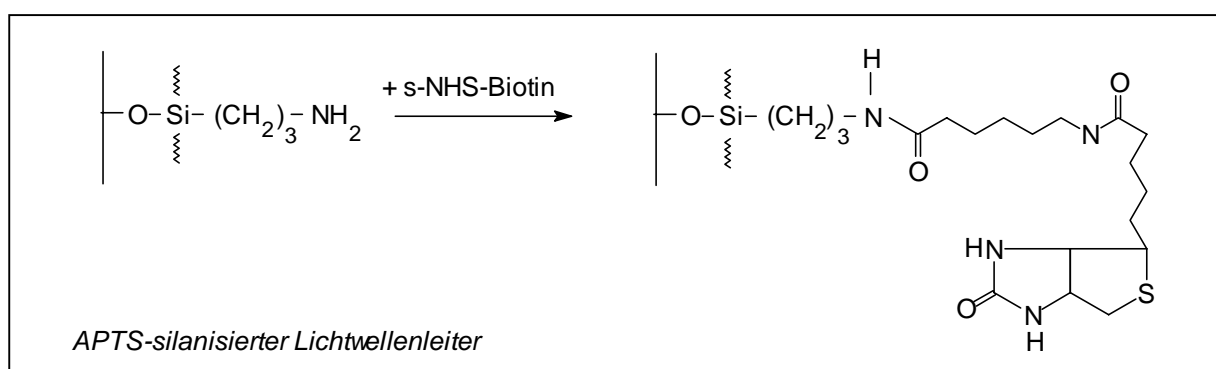


Abb. 2.9.: Kopplung von Avidin bzw. Streptavidin über funktionelle Biotingruppen auf der Oberfläche.

- Die APTS-silanisierten Lichtwellenleiter wurden ü. N. mit einer 1 mM Lösung aus Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate, Pierce, Rockford) in 10

mM HEPES inkubiert, anschließend mit dest. H₂O gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in PBS gelagert.

2.1.1.6. Direktsynthese von Oligonukleotiden an Lichtwellenleiter

Um eine alternative Kopplungsmethode von Oligonukleotiden an die Lichtwellenleiter zu etablieren, wurde das Phosphoramiditverfahren auf planare Oberflächen übertragen. Die Methode dient zur chemischen DNA-Festphasensynthese, wobei häufig CPG (*controlled pore glass*) als Trägermaterial verwendet wird.

Die mehrstufige Synthese an den Chips beginnt mit einer Silanisierung mit GOPS (s. Kap. II. 2.1.1.5.2.), die endständige Epoxygruppen auf der Oberfläche erzeugt. Anschließend wurde als Linker Hexaethylenglykol konjugiert (s. Abb. 2.10.), der in einer Arbeit von Maskos *et al.* (1992) optimiert wurde :

- 5 g Hexaethylenglykol wurden mit 50 µl konz. H₂SO₄ vermischt und ü. N. bei 90 °C mit dem Lichtwellenleiter inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Chip sorgfältig mit Methanol gespült und bei 50°C getrocknet

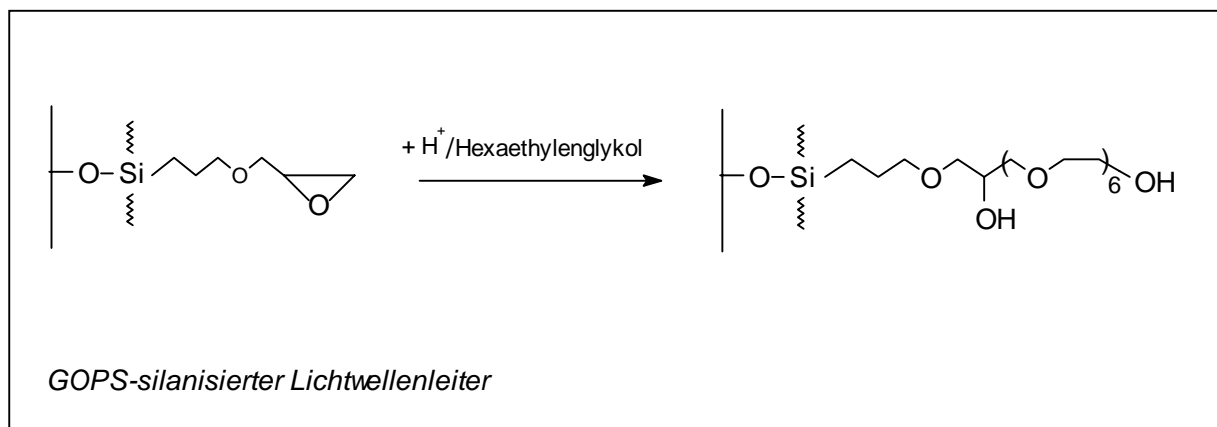


Abb. 2.10.: Bindung eines Hexaethylenglycol-Spacers an die GOPS-silanisierte Lichtwellenleiteroberfläche.

Abbildung 2.11. zeigt schematisch das Phosphoramiditverfahren an Hexaethylenglykol-modifizierten Lichtwellenleitern :

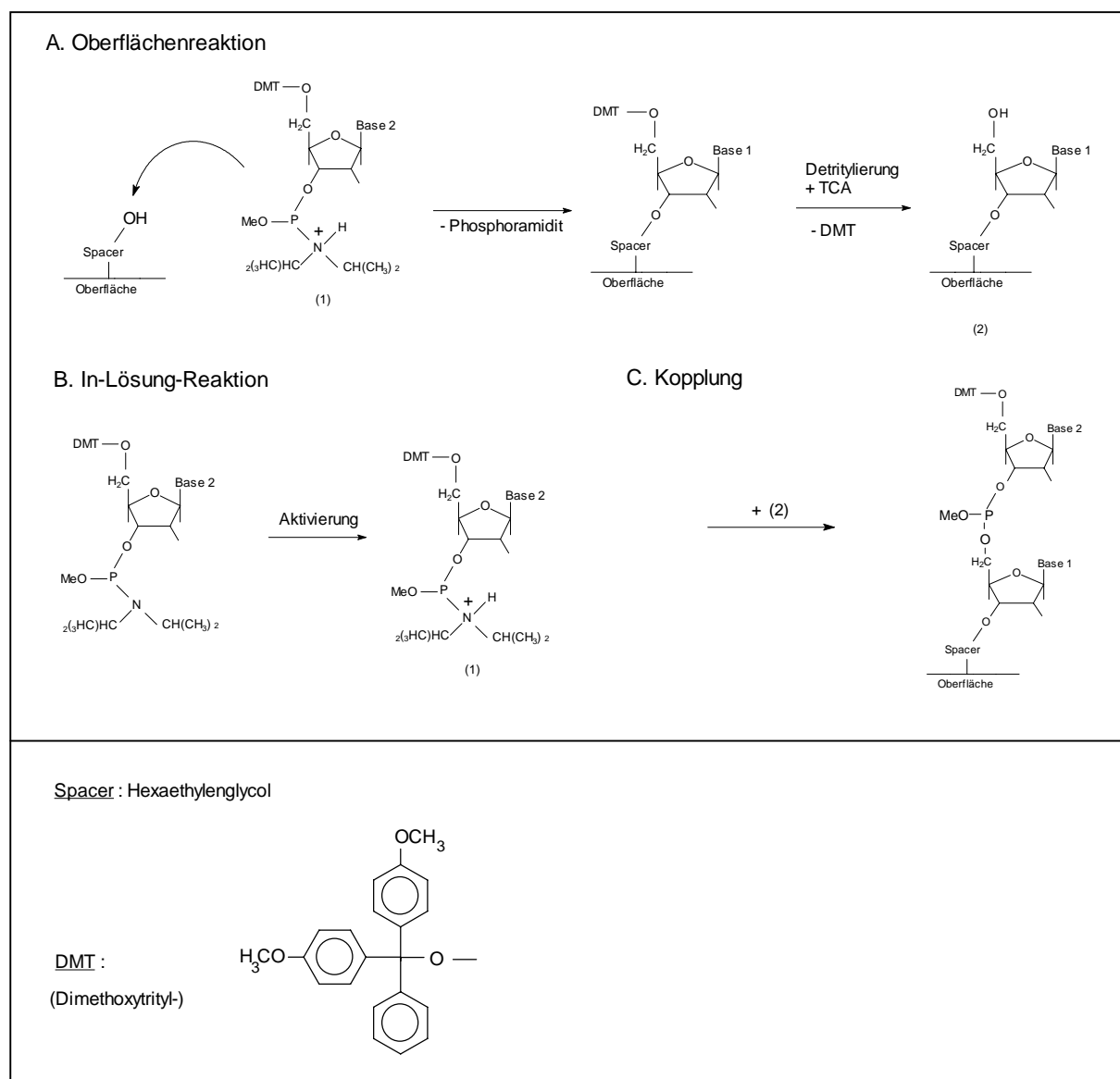


Abb. 2.11.: Schematische Darstellung der Festphasensynthese von Oligonukleotiden nach dem Phosphoramiditverfahren.

Das Schema zeigt ein bereits oberflächengebundenes Nukleotid, das durch eine Dimethoxytrityl-(DMT)-Gruppe geschützt ist. Nach Spülschritten mit Acetonitril erfolgt die Abspaltung der DMT-Gruppe mit Trichloressigsäure (TCA), so daß eine reaktive Hydroxylfunktion für den nächsten Kopplungsschritt bereit steht. Dieser Schritt der Detritylierung wird von dem Gerät zur Quantifizierung der Kopplungseffizienz benutzt, da das DMT spektrophotometrisch erfaßbar ist (436 nm).

Im *nächsten Schritt* der Synthese wurde ein durch Tetrazol aktiviertes Phosphoramidit dazugegeben. Die Verbindung besteht aus einem derivatisierten Nukleosid, dessen methylierte Phosphitgruppe mit einer Diisopropylamingruppe verknüpft ist. An der 5'-Hydroxygruppe des Zuckers befindet sich ebenso eine Dimethoxytrityl-Gruppe, die nach der

Kopplungsreaktion des Moleküls mit der Oberfläche verhindert, daß die Kette unspezifisch weiter wächst.

Zuvor nicht gekoppelte 5'-Hydroxylfunktionen werden acetyliert („capping“), damit sie am weiteren Reaktionszyklus nicht teilnehmen können (in Abb. 2.12. nicht dargestellt).

Um die Bindung zwischen den einzelnen Nukleotiden, dreiwertige Phosphittriesterbücken in stabile Phosphatbindungen mit fünfwertigem Phosphor zu überführen, wird der Polynukleotid mit Jod oxidiert.

Anschließend steht die Oberfläche für einen weiteren Zyklus bereit, der wieder mit einer Aktivierung der Oberfläche durch Detritylierung beginnt.

Durchführung der Direktkopplung

Die hexaethylenglycol-modifizierten Chips wurden in eine Fließzelle fixiert, die eine Fläche von ca. 0.8 cm^2 auf der Oberfläche bedeckte und in eine kommerzielle DNA-Syntheseapparatur (Gene Assembler, Pharmacia, Schweden) integriert. Die eigentliche Synthesäule wurde dabei durch die Zelle ersetzt.

Zur Reaktionsdurchführung wurden die Lösungen in folgenden Konzentrationen angesetzt bzw. behandelt:

- Amidite : 400 mg wurden in 5 ml Acetonitril gelöst.
- Tetrazol : 700 mg wurden in 20 ml Acetonitril gelöst.
- 1%ige TCA-Lösung: 10 g Trichloressigsäure wurden in 1 l 1,2-Dichlorethan gelöst.
- Oxidation : 0.5 g Jod wurden in 130 ml Acetonitril gelöst, anschließend wurden 12 ml 2,4,6-Trimethylpyridin und 60 ml H_2O hinzugefügt.
- Capping A : 6 g 4-Dimethylaminopyridin wurden in 100 ml Acetonitril gelöst.
- Capping B : 50 ml Acetonitril und 30 ml 2,4,6-Trimethylpyridin und 20 ml Essigsäureanhydrid.
- Acetonitril wurde über Molekularsieb 3A getrocknet.

Über die Gene Assembler Software konnte die DNA-Synthese gesteuert werden, wobei ein Standard-Syntheseprogramm nach folgendem Schema verlief :

1. **Aktivierung.** Das Tetrazol aktivierte das 3'-Ende des ersten Nukleotids.
2. **Kopplung.** Die Hydroxylfunktion des oberflächengebundenen Hexaethylenglycols bildete eine Phosphortriesterbrücke mit dem aktivierten Nukleotid (2 min Reaktionszeit).
3. **Waschschritt.** Eine Spülung mit Acetonitril entfernte überschüssige Reaktanden.
4. **Capping.** Nicht reagierte Hydroxylfunktionen wurden durch eine Lösung aus Essigsäureanhydrid, 4-Dimethylaminopyridin und 2,4,6-Collidin (Trimethylpyridin) geschützt.
5. **Waschschritt.** Eine Spülung mit Acetonitril entfernte die Capping-Lösung.
6. **Oxidation.** Die Zugabe einer Jodlösung für 1 min oxidierte den dreiwertigen zum fünfwertigen Phosphor.
7. **Waschschritt.** Spülung mit Acetonitril.
8. **Detritylierung.** Die DMT-Gruppe wurde durch 1 %ige Trichloressigsäure-Lösung vom ersten Nukleosid entfernt (1.5-3 min). Damit war die für einen neuen Kopplungszyklus aktiviert.
9. **Waschschritt.** Eine Spülung mit Dichlorethan entfernte das orangefarbige DMT-Ion, dessen Absorption zur Konzentrationsbestimmung photospektroskopisch untersucht wurde. Eine Spülung mit Acetonitril stellte wasserfreie Kopplungsbedingungen sicher.

Nach Ende der Synthese wird der Chip aus der Fließzelle entnommen. Vor der Nutzung des Chips im Gitterkoppler wird die letzte Schutzgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids durch Behandlung mit 25%igem NH_3 (1h bei 80°C) abgespalten.

2.1.2. BIAcore

2.1.2.1. Grundlagen

81 Jahre nach der Entdeckung des Effektes der Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, *SPR*) durch Wood wurde 1983 erstmalig von Liedberg *et al.* vorgeschlagen, das Phänomen zu verwenden, um eine sensorisch aktive Oberfläche zu erzeugen. Der SPR-Aufbau gestattete die Analyse von Gasen, die mit der Oberfläche wechselwirkten. Heutzutage sind einige Geräte, die dieses Prinzip nutzen, kommerziell erhältlich: Pharmacia (Uppsala, Schweden) vertreibt als Marktführer und erster Anbieter seit 1990 das BIAcoreTM-Gerät (Löfås *et al.*, 1990), das zur Untersuchung und Charakterisierung von Affinitätsreaktionen weitverbreitete Anwendung fand (Malmquist, 1993 und Mani *et al.*, 1994). Das Gerät PlasmoonTM der Firma BioTuL (München), seit August 1999 erhältlich, verwendet wie das BIAcore Hydrogel beschichtete Goldchips, die über acht separate Reaktionsküvetten angesteuert werden können.

Grundprinzip aller SPR-Sensoren ist das Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in einem dünnen Metallfilm (Kretzschmann *et al.*, 1968). Die durch Wechselwirkung mit Photonen entstandenen Schwingungen, sog. *Polaritone* oder *Plasmone* breiten sich über einige Mikrometer wellenförmig in der Metallschicht aus (Lawrence *et al.*, 1992). Vergleichbar den durch Totalreflexion geführten Wellen bei Gitterkopplern sind die Schwingungen verbunden mit einem evaneszenten Feld, das über die Phasengrenze in die Umgebung hineinreicht. Wechselwirkungen von Molekülen mit dem evaneszenten Feld können hochsensitiv detektiert werden.

Der SPR-Effekt tritt bei Verwendung von ca. 50 nm dünnen Metallschichten auf (z. B. Ag, Au, Al, Pt), wobei häufig Goldschichten durch gute Kopplungseigenschaften zum Einsatz kommen. Über ein Prisma, das von der Rückseite des Chips gegen ein Glassubstrat drückt, wird monochromatisches Licht eingestrahlt und das Winkelspektrum des reflektierten Lichts über eine CCD-Zeile (*charge coupled device*) ausgelesen (Abbildung 2.12.). Da Licht einer bestimmten Wellenlänge und eines bestimmten Einstrahlwinkels zur Anregung des SPR-Effektes absorbiert wird, erscheint in der Reflexion ein Intensitätsminimum. Kommt es nun auf der Goldoberfläche zu geringen Änderungen der Massebeladung, z. B. durch Anlagerung von Proteinen oder Nukleinsäuren, so wechselwirken diese Moleküle mit dem elektromagnetischen evaneszierenden Feld. Ergebnis dieser Wechselwirkung ist eine detektierbare Veränderung des Intensitätsminimums im Reflexionswinkelspektrum, die mit der Massezunahme korreliert.

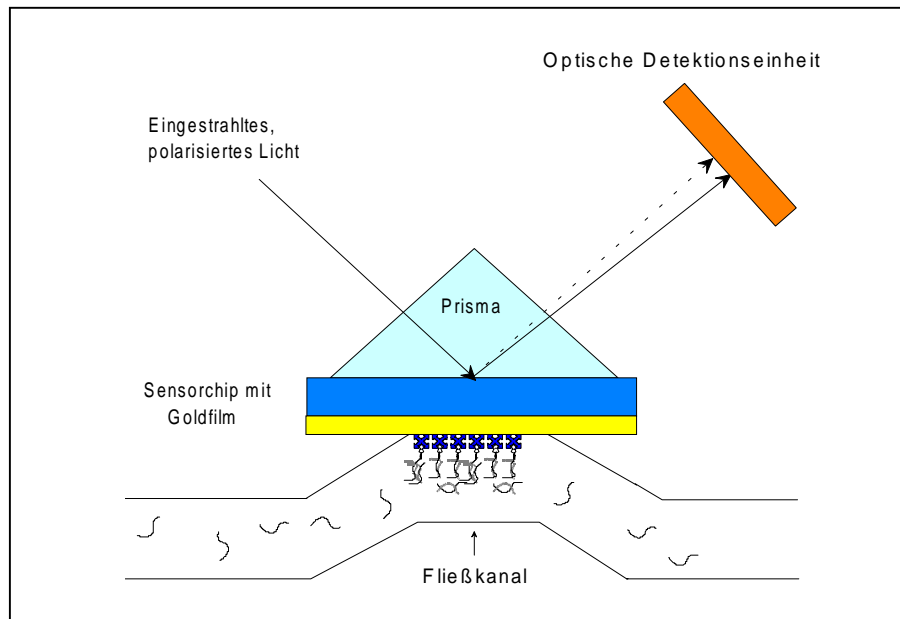


Abb. 2.12. : Schematischer Aufbau eines SPR-Systems. Durch Einstrahlung polarisierten Lichts von der rückwärtigen Seite des Sensorchips wird eine Plasmonenresonanz-Schwingung (SPR) im Goldfilm angeregt, die mit einem evaneszenten Feld verbunden ist. Dieses elektromagnetische Feld, das in den Fließkanal hineinreicht, wird durch Massen auf der Sensoroberfläche beeinflusst. Ändert sich im Laufe einer beobachteten Oberflächenreaktion die Masse, so verändert sich das aufgezeichnete Reflexionsspektrum. Die Veränderung, gemessen in Resonance Units, korreliert mit der Veränderung der Massenbeladung.

Das BIAcore gibt das Sensorsignal in sog. *Resonance Units RU* an, wobei willkürlich festgesetzt wurde, daß 1000 RU einer Anlagerung von 1 ng/mm^2 Protein entspricht (Stenberg *et al.*, 1991 und Fagerstam *et al.*, 1992). 1000 Resonance Units entsprechen ebenfalls einer Ablenkung des Reflexionswinkels von 0.1° . Dargestellt werden die Daten in einem Diagramm mit Ordinate [RU] und Abszisse [Zeit].

Watts *et al.* (1995) und Bier (1997) haben demonstriert, daß Protein- und Oligonukleotidlösungen vergleichbare Brechungsindizes besitzen und in Ihrem SPR-Response keine signifikanten Unterschiede zeigen. Daher wurde die Signal-Masse-Korrelation für Proteine in dieser Arbeit auf DNA übertragen.

2.1.2.2. Verwendete BIAcore-Chips

Es wurden zwei unterschiedliche Sensorchips verwendet:

- CM5-Sensorchips, die auf der Goldoberfläche ($1\text{-}10 \text{ ng/mm}^2$, Dicke ca. 50 nm) eine Dextranmatrix (*Hydrogel*) besitzen, die carboxymethyliert waren.
- SM5-Sensorchips, die CM5-Chips entsprechen, jedoch mit Streptavidin vorbeschichtet waren.

Das über Thiolgruppen an das Gold gekoppelte Hydrogel bestand aus linearen, hydrophilen Dextranmolekülen, die eine Schichtdicke von ca. 100 nm ausmachten (Haase, 1996). Die Carboxylgruppen, deren pK_a -Wert bei 4 liegt, waren bei neutralem pH der verwendeten Laufpuffer vollständig ionisiert, so daß die Abstoßungskräfte der Matrixmoleküle stark war.

Allgemeiner Meßablauf am BIAcore :

Die Software *BIAcore-Control* ermöglichte eine gezielte Steuerung der Temperatur der Fließzelle (zwischen 20-37 °C) und der Fließrate, die i. d. R. zwischen 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ variierte.

Nach dem Einbau des Sensorchips, wurde das Fließsystem für 6 min bei hoher Fließrate (100 – 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$) mit entgastem Puffer gespült (Working tool: *Prime*). Ein anschließender Meßzyklus erfolgte bei einer Fließrate von 2 - 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ nach dem folgenden Schema, wobei ein mit Streptavidin vorbeschichteten Sensorchips (SM5) benutzt wurde :

- Spülen der Oberfläche zur 2 – 5 min zum Erhalt einer Grundlinie.
- Injektion der biotinylierten Oligonukleotide ($\sim 1 \mu\text{M}$, injiziertes Volumen : 60 μl) für 12 min.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems zur Entfernung unspezifisch gebundener biotinylierter Sonde für 2 – 10 min.
- Injektion der Proben- bzw. Standardlösung zur Hybridisierung (0.05 – 10 μM , injiziertes Volumen : 60 μl) für 12 – 30 min.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems für 2 – 10 min mit Carrierpuffer, um unspezifisch gebundene Oligonukleotide zu entfernen.
- Regenerierung der Sensoroberfläche durch 4 min Spülen mit 50 mM NaOH.
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit Carrierpuffer für 2 – 10 min, um den Sensorchip für eine erneute Probenaufnahme bereitzustellen.

2.1.2.3. Oberflächenmodifikationen der BIAcore-Chips

Kopplung über EDC/NHS

Bei funktionellen *Carboxylgruppen* auf der Sensoroberfläche :

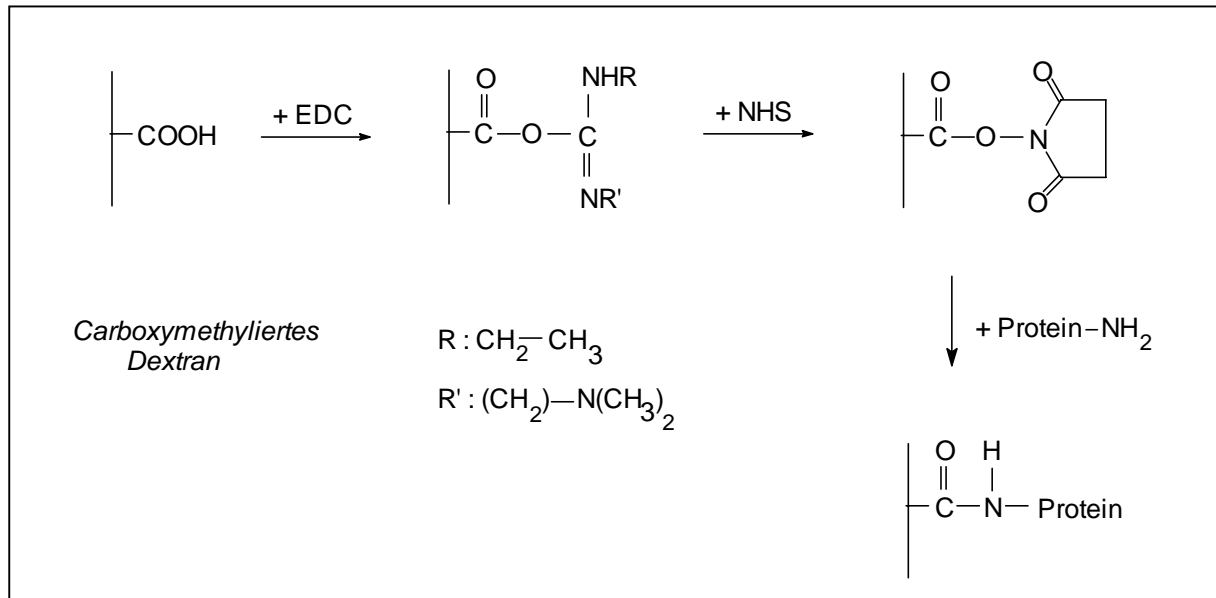


Abb. 2.13.: Kopplung von Proteinen über EDC/NHS.

- Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte für 30 min bei RT mit einer Mischung aus 50 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid) und 200 mM EDC ((1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid). Nach einer Pufferspülung erfolgte die Kopplung des Liganden über dessen Aminofunktionen in 10 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4.5) durch 30 minütige Inkubation und anschließenden wiederholtem Spülen. Um nicht reagierte, aktive Ester abzusättigen, wurde die Sensoroberfläche für 12 min mit einer 1 M Ethanolamin-Lösung, pH 8.5, inkubiert.

Kopplung über Biotingruppen

Bei funktionellen *Carboxy-* bzw. *NHS-Gruppen* auf der Sensoroberfläche:

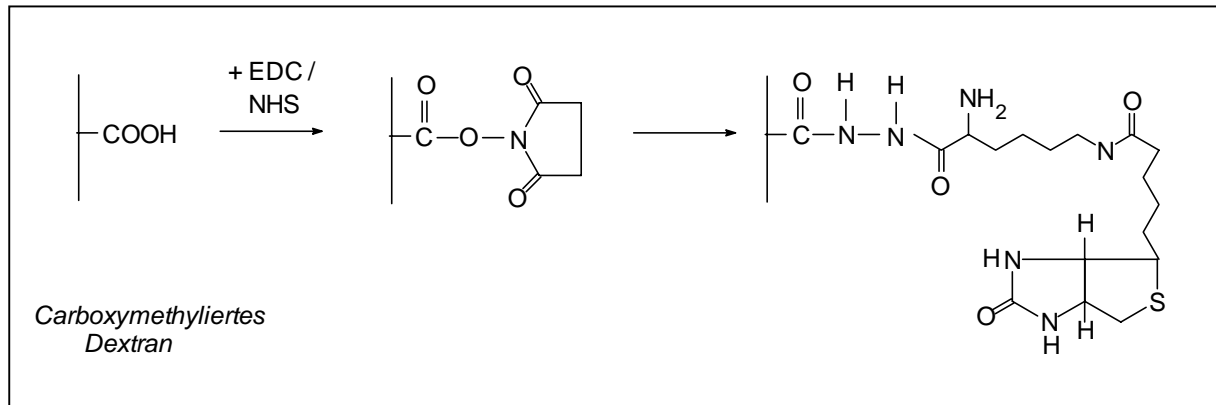


Abb. 2.14.: Kopplung von Avidin bzw. Streptavidin über funktionelle Biotingruppen auf dem BIAcore-Sensorchip.

- Eine über EDC/NHS aktivierte Oberfläche der CM5-BIAcore-Chips wurde mit 35 μ l 15 mM Biocytin-Hydrazid-Lösung in Na-Acetat-Puffer (10 mM, pH 4.3) für 17.5 min überströmt. Anschließend wurde dreimal je 4 min mit 30 mM HCl gespült.

2.1.3. Meßauswertung bei den optischen Affinitätssensoren

Anhand eines beispielhaften Meßablaufs soll verdeutlicht werden, welche Aussagen aus den Meßdaten für eine beobachtete Affinitätsreaktion abzuleiten waren.

Abbildung 2.15. zeigt schematisch die Immobilisierung des bindungsvermittelnden Proteins Avidin auf die Sensoroberfläche.

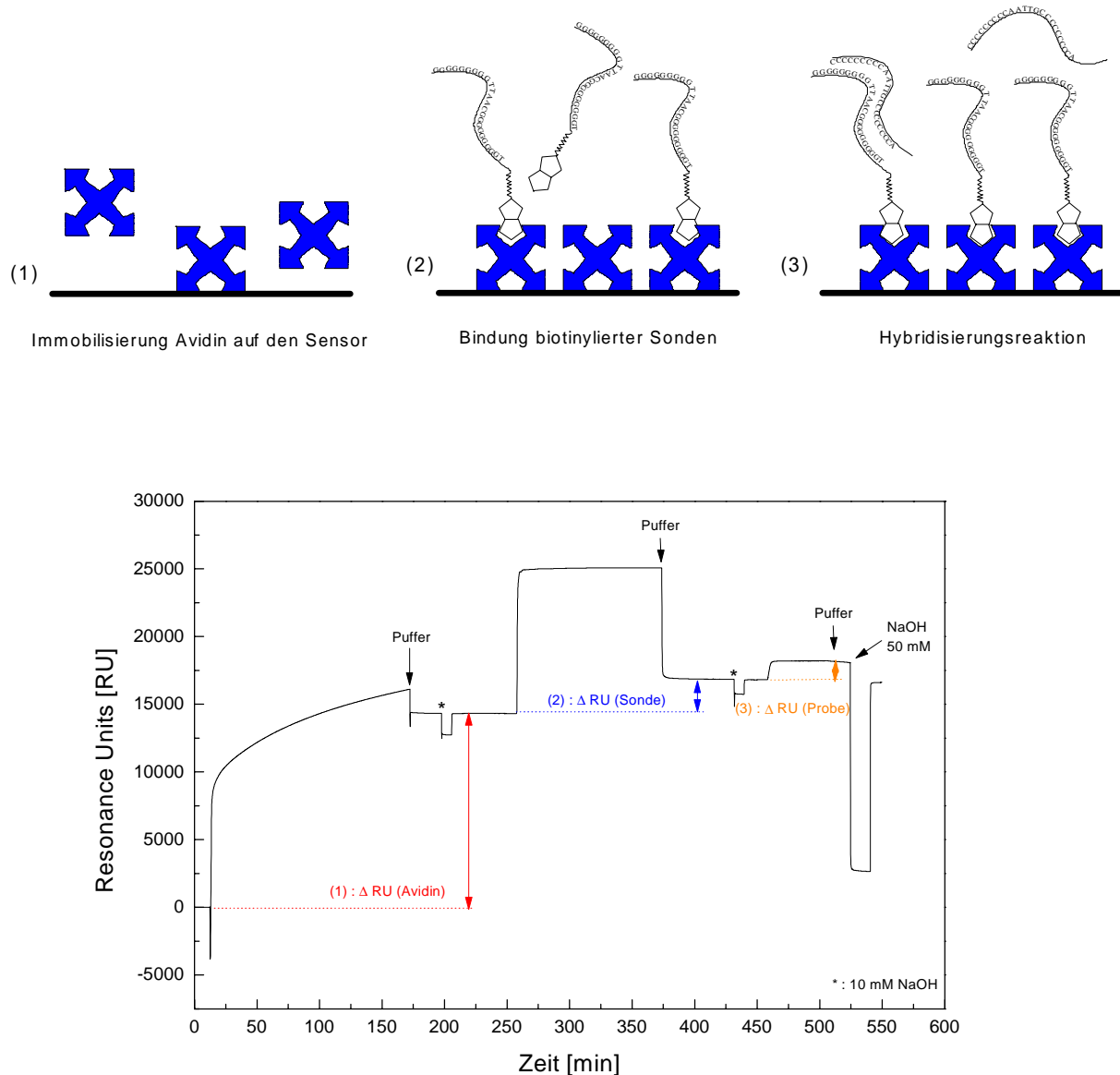


Abb. 2.15. : Oben dargestellt ist ein Schema der Abläufe am Gitterkoppler bzw. am BIAcore. Die Messung beginnt mit der Immobilisierung von Avidin, das im zweiten Schritt biotinylierte Sonden-Moleküle bindet. Abschließend folgt die Hybridisierung mit Proben-Oligonukleotid. Unten dargestellt ist ein Schema, das die Reaktionsverfolgung mit Hilfe des optischen Sensors zeigt. So kommt es durch die Anlagerungen der Moleküle jeweils zu on-line verfolgbarer Massezunahme auf dem Sensor, die eine Signalverschiebung bewirkt.

Ausgewertet wurden Signale, die vor und nach der Anlagerung der einzelnen Komponenten erhalten wurden, wobei jeweils der identische Laufpuffer über die Sensoroberfläche geführt

wurde. Der Brechungsindex der Pufferlösung nahm einen großen Einfluß auf das Sensorsignal, so daß für eine Charakterisierung der Massezunahme eine vergleichbare Pufferzusammensetzung essentiell war.

Von der Signifikanz von Signalen (Meßempfindlichkeit) wurde ausgegangen, wenn das erhaltene Signal dreimal größer als das Grundrauschen war. Für die optischen Detektoren bedeutete das folgende Signalthöhen der Signifikanz :

Gitterkoppler : Meßsignal $\Delta N_{\text{eff}} > 3 - 4 \cdot 10^{-6}$

BIAcore : Meßsignal $\Delta RU > 5 - 10$

Aus den erhaltenen Meßdaten für die Anlagerung wurden verschiedene Zusammenhänge abgeleitet, deren Berechnung hier dargestellt ist:

Bindungsverhältnis

Um das Verhältnis zwischen Avidin und der biotinylierten Sonde zu berechnen, mußte die unterschiedliche Masse der beiden Moleküle berücksichtigt werden :

$$\text{Bindungsverhältnis} = \frac{\text{Signal Sonde} / \text{Molgewicht Sonde}}{\text{Signal Avidin} / \text{Molgewicht Avidin}} \quad (6)$$

Hybridisierungsverhältnis

Das in Folge häufig verwendete *Hybridisierungsverhältnis* gibt Aufschluß über den prozentualen Anteil der oberflächengebundenen, mit Proben-Oligonukleotiden hybridisierten Sonden an den insgesamt immobilisierten Sonden :

$$\text{Hybridisierungsverhältnis} = \frac{\text{gebundene Menge an Probe [mol]} \times 100}{\text{gebundene Menge an Sonde [mol]}} \quad (7)$$

2.2. Oberflächencharakterisierung

2.2.1. Grundlagen des Atom-Kraftmikroskops (Atomic Force Microscope, AFM)

Zur Visualisierung biologischer Systeme wie Nukleinsäuren, Proteinen und ganzen Zellen hat sich in den letzten Jahren die Atom-Kraftmikroskopie etabliert und herkömmliche Methoden wie Elektronenmikroskopie teilweise ersetzt bzw. ergänzt. Die neu entwickelte Methode (Binnig *et al.*, 1986), häufigster Vertreter aus der Familie der Sondenmikroskopie, nutzt hochfeine Spitzen, die über eine Oberfläche geführt werden. Die Wechselwirkungen dieser nur wenige Nanometer breiten Spitze werden durch Ablenkung einer Mikrofeder, an der die Spitze befestigt ist, aufgezeichnet. Dazu wird ein Laserstrahl von der Rückseite der Feder reflektiert und über einen positionssensitiven Photodetektor vermessen. Trifft die Mikrofeder auf einen Widerstand, erfolgt eine leichte Krümmung, die hochempfindlich registriert werden kann. Mit diesem Meßaufbau sind bereits Auflösungen bis in den atomaren Bereich (Heinz *et al.*, 1999) erreicht worden.

Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung des AFM ist die Möglichkeit, biologisches Material in Luft oder flüssiger Phase in seiner natürlichen Umgebung zu untersuchen, wobei aufwendige Probenvorbereitung wie das Besputtern mit dünnen Goldschichten bei REM-Aufnahme entfällt. Durch den Einsatz eines AFMs ist zudem eine extrem gute Höhenauflösung (<1nm) der untersuchten Materialien möglich, jedoch ist die Information über die laterale Ausdehnung eines Objektes, determiniert durch den Kurvenradius der Spitze weit ungenauer. Die Objekte erscheinen folglich größer als sie eigentlich sind. Deshalb wurde kürzlich versucht, herkömmliche Silizium- oder Siliziumnitrid-Spitzen, die einen Kurvenradius von 20-60 nm besitzen, durch sog. Kohlenstoff-Nanotubes zu ersetzen. Ein Radius von 5-10 nm konnte durch laser-induzierte Verdampfung von Kohlenstoff und gezielte Abscheidung an der Spitze einer Siliziumspitze erzeugt werden (Hafner *et al.*, 1999). Mit Verkleinerung der Spitzen sind in Zukunft weitere Auflösungsverbesserungen bis in den atomaren Bereich zu erwarten.

Tabelle 2.1. zeigt einen Vergleich zwischen optischen, Rasterelektronen- und Atom-Kraftmikroskopen.

	Optische Mikroskope	REM	AFM
Probenumgebung	Luft, Gase Flüssigkeit Vakuum	Vakuum	Luft, Gase Flüssigkeit Vakuum
Auflösung : x,y	~ 0.5 μm	~5 nm	~0.1 - 3 nm
Auflösung : z	keine	~ keine	0.01 nm
Probenvorbereitung	gering	Gefriertrocknung Coating	Keine

[REM : Rasterelektronenmikroskop]

Tab. 2.1. : Vergleich zwischen optischen-, rasterelektronischen und Atom-Kraftmikroskopen

Während die Auflösung von Lichtmikroskopen nach Abbe und Nyquist durch die verwendete Wellenlänge begrenzt ist (einige 100 nm), erreichen Elektronenmikroskope mittels kürzerer Wellenlängen von Elektronenstrahlen eine Auflösung in Nanometerbereich. Atom-Kraftmikroskope dagegen werden in ihrer Auflösung durch die Qualität der verwendeten Spitzen begrenzt.

Abbildung 2.16. zeigt den schematischen Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Meßanordnung. Dabei bewegt hierbei ein Piezoscanner die Probe relativ zu einer stationären Spitze, wobei der umgekehrte Fall in anderen Geräten realisiert wurde.

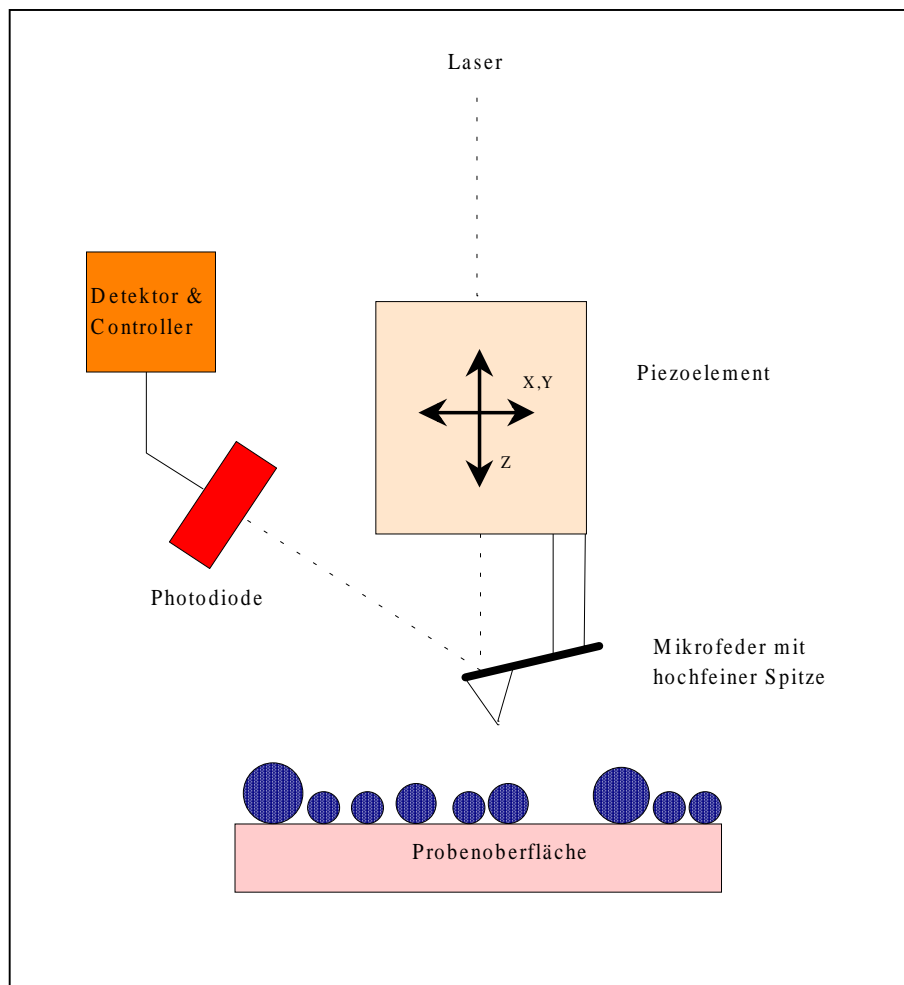


Abb. 2.16. : Schematische Darstellung des Aufbaus eines Atomkraft-Mikroskopes.

Mit dem AFM sind mehrere Meßmodi möglich, die sich in der Intensität der Spitze-Probe-Wechselwirkung unterscheiden. Die beiden nachfolgend Beschriebenen wurden in dieser Arbeit ausschließlich angewendet :

- **Messung im Kontakt-Modus**

Zur Durchführung einer Messung im Kontaktmodus wird die Probe, die auf einem piezoelektrischen Scanner befestigt ist, der Mikrofeder angenähert. Tritt die Spitze der Feder über Van-der-Waals, Kapillar- oder elektrostatische Kräfte in Wechselwirkung, signalisiert die veränderte Reflexion des Lasers einem Regelement das Erreichen der Oberfläche. Der Regler sorgt beim Abscannen der Oberfläche für konstante Entfernung zur Oberfläche. Die dabei aufgewendete Kraft kann manuell eingestellt werden. Nachteil des Kontaktmodus sind laterale Scherkräfte, die biologische Proben verschieben bzw. zerstören können:

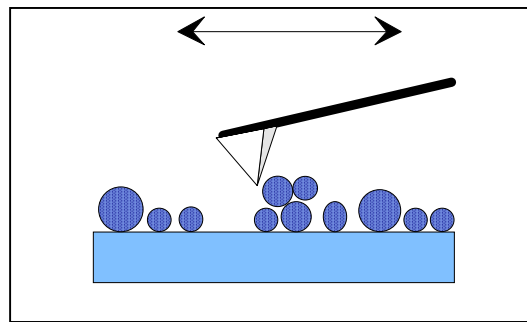


Abb. 2.17. : *Kontakt-Meßmodus des AFM : Spitze des Instruments bleibt in räumlicher Nähe zum untersuchten Material.*

- **Messung im Tapping-Modus**

Um den u. U. hohen Wechselwirkungen der Spitze mit dem biologischen Material durch Einsatz des Kontaktmodus auszuweichen, verwendet man den Tapping-Modus, bei dem die Feder bei einer hohen Frequenz oszilliert. Berührt die feine Spitze die Oberfläche, sinkt die Schwingungsamplitude. Über einen Regelkreis wird eine nur leichte Berührung der Probe erreicht, indem die Amplitude konstant gehalten wird. Bei Untersuchungen in flüssiger Phase arbeitet man viskositätsbedingt bei einer niedrigeren Oszillationsfrequenz.

Der Vorteil des Tapping-Modus liegt in der niedrigen aufgewendeten Kraft, die eine Beschädigung weicher Oberflächen weitgehend ausschließt. Außerdem wird eine höhere laterale Auflösung erreicht (1-5 nm):

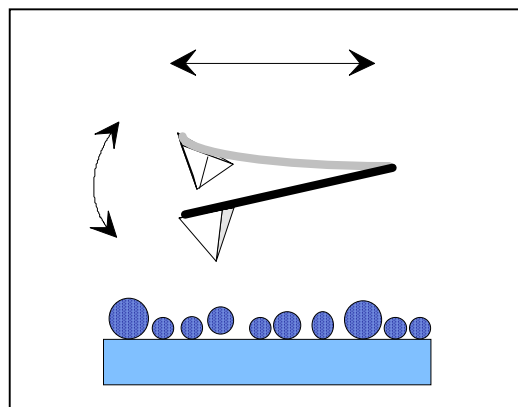


Abb. 2.18. : *Tapping-Meßmodus des AFM: Spitze oszilliert oberhalb der Probe, weshalb der Meßablauf weitgehend berührungslos und schonend ist.*

Einsatz des AFM zur Charakterisierung von Biosensoroberflächen

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendung von Biosensoren ist es, die Beschaffenheit der Oberfläche hinsichtlich Homogenität und molekularer Anordnung der Rezeptor-Biokomponente zu verstehen und zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde in der Arbeit das AFM als analytische Methode getestet.

Zwei zentrale Fragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen und werden in der Folge beschrieben :

- Kann man das Atom-Kraftmikroskop nutzen, um Aussagen über die Schichtdicke und Proteinanordnung von Avidin auf der Biosensoroberfläche zu gewinnen ?
- Wie verhalten sich Nukleinsäuren auf reinen und modifizierten Oxidschichten ?

Aus beiden Teiluntersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Arbeit mit den optischen Detektoren gezogen werden.

2.2.2. Meßaufbau der AFM-Apparatur

Für die Untersuchungen wurde ein Instrument der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, Cal. USA) verwendet, das die Beobachtung von Proben in verschiedenen Scan-Moden ermöglichte. Dabei wurde Kontakt- wie auch Tapping-Modus bei den Messungen in der trockenen oder flüssigen Phase genutzt. Die verwendeten Spitzen für den Kontakt-Modus bestanden aus pyramidal geformtem, geschärftem Siliziumnitrid, das mit einer 100 nm langen Feder mit einer Federkonstanten von 0.58 N/m verbunden war. Der Kurvenradius der Spitze, der deren Qualität determiniert, lag zwischen 20 bis 60 nm. Die Reproduzierbarkeit der Spitzen ist während des Herstellungsprozesses nur begrenzt gegeben, so daß größere Varianzen im Kurvenradius auftreten.

Bei Verwendung des Tapping-Modus oszillierte die Spitze bei einer Frequenz zwischen 200 bis 400 kHz bei Vermessung von trockenen Proben und zwischen 10 bis 40 kHz bei Messungen in der flüssigen Phase. Die Federkonstante der Tapping-Modus Spitzen lag mit 20 bis 100 N/m entsprechend höher, wobei der Kurvenradius der Spitzen, die aus kristallinem Silizium bestanden, mit 5 bis 10 nm sehr niedrig war. Als Scanrate wurde typischerweise 1 bis 2.5 Hz gewählt.

Der Setpoint-Parameter, der die aufgewendete Kraft determiniert, hält die Reflexion (Kontaktmodus) bzw. Amplitude (Tapping-Modus) auf einen bestimmten Wert.

2.2.3. Bearbeitung und Charakterisierung der AFM-Aufnahmen

Die erhaltenen AFM-Aufnahmen wurden mit Hilfe der Nanoscope Software bearbeitet und ausgewertet, wobei von Filtern und berechneten Parametern Gebrauch gemacht wurde. Die Charakterisierung der Aufnahmen erfolgte dabei nach identischer Bearbeitungsprozeduren für jede AFM-Aufnahme.

- Filter zur planare Einebnung :“Flatten“

Um Artefakte wie vertikales Driften des Scanners, Offsets und Beugungen zu entfernen, wurde jeweils ein Filter verwendet, der die Polynome der ersten oder zweiten Ordnung von den Scandaten abzieht (Nanoscope Handbuch). Zu berücksichtigen war, daß es durch diese mathematische Behandlung der Daten zur Veränderung der Höheninformation in z-Richtung kommt.

- Berechnung der Rauigkeit

Mit Hilfe der Rauigkeit RMS (root mean square roughness) konnte die gescannte Oberfläche in Bezug auf Höhenabweichungen in z-Richtung charakterisiert werden. Die Rauigkeit entspricht der Standardabweichung aller z-Werte über eine benutzerdefinierte Fläche und berechnet sich wie folgt :

$$\text{RMS} = \frac{\sum_i^N (Z_i - Z_{\text{ave}})^2}{N} \quad (8)$$

Mit : Z_{ave} = Mittelwert aller z-Daten über eine definierte Fläche
 Z_i = Aktueller z-Wert
 N = Anzahl aller Werte über eine definierte Fläche

- Berechnung der Höhenverteilung (Bearing analysis)

Mit Hilfe der Höhenverteilung konnte evaluiert werden, wieviel Prozent der gescannten Punkte in einem definierten Bereich über bzw. unter einer gegebenen Höhe lag. Der Abstand zwischen dem höchsten Punkt und der Oberfläche innerhalb des Bereichs konnte ebenso bestimmt werden (bearing depth). Damit standen im Vergleich zur Rauigkeit, die lediglich ein Mittelwert über die Höhenabweichung darstellt, zusätzliche Aussagen über die Oberflächeneigenschaften einer Probe zur Verfügung.

2.2.4. Untersuchungen der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter mit AFM

Die Chips wurden mit Hilfe der unter Kapitel II. 2.1.1.5.1. beschriebenen Prozesse gereinigt, u. U. silanisiert und unter Ausnutzung kovalenter Kopplungsmethoden mit Avidin beschichtet.

Vor der Verwendung im AFM wurden die Chips mit 50 mL deionisiertem Wasser gespült und anschließend im N₂-Strom bzw. bei 80°C im Brutschrank getrocknet.

Die Experimente, die die physikalische Verschiebung von Proteinen auf der Oberfläche der Chips beschreiben, sind im Kontakt-Modus mit einer Scanrate von 4 Hz und einem Setpoint von 6.0 V aufgenommen worden.

2.2.5. Untersuchungen von DNA auf planaren Trägern mit AFM

Als Modell für die Bindung von DNA wurde das Plasmid pUC19 (2686 bp) aus E. coli DH5α verwendet, das auf modifizierte Mica („Glimmer“-)Oberflächen immobilisiert wurde. Dazu wurde die obere Schicht des Kristalls mit Hilfe eines Skalpells entfernt, um eine saubere und glatte Oberfläche zu erhalten.

Die Proben wurden im Anschluß an die Inkubationsphase mit Stickstoff trocken geblasen oder ü. N. im Exsikator getrocknet, um Restfeuchtigkeit zu entfernen.

Für Untersuchungen der DNA in Flüssigkeit wurde jeweils APTS-silanisiertes Mica eingesetzt.

Vorbehandlung von Mica mit Ca²⁺ oder Mg²⁺-Ionen haltigem Puffer

Frisch gespaltenes Mica wurde für mindestens 4 h in einer 10 mM Calcium- oder Magnesiumnitrat-Lösung gelagert und anschließend mit 200 ml H₂O gewaschen. Nach einer Trocknung im N₂-Strom wurde 2 µl Plasmid-DNA Lösung (in H₂O) variierender Konzentration aufpipettiert, die nach 3 bis 30 min mit 50 ml H₂O wieder entfernt wurde.

Immobilisierung von Plasmid in Mg²⁺-Ionen haltigem Puffer

2 µl Plasmid-DNA Lösung in 10 mM Magnesiumnitrat wurde für 3 bis 30 min inkubiert und anschließend mit 50 ml H₂O gewaschen.

Immobilisierung von Plasmid aus Aminopropyltriethoxysilan (APTS)-silanisiertem Mica

100 µl einer 1%igen APTS-Lösung in dest. H₂O wurde für 5 min inkubiert, anschließend gewaschen und getrocknet. 2 µl einer Plasmid-DNA-Lösung wurden auf dem entsprechend vorbehandelten Trägermaterial nach 3 bis 30 min Inkubationszeit mit 50 ml H₂O gewaschen, daß Mica getrocknet und anschließend gescannt.

2.3. Spezifischer Nachweis des Bakteriums *Escherichia coli* DH5 α

2.3.1. Grundlagen

Der Nachweis von speziellen Mikroorganismen nimmt in der Bioanalytik einen besonderen Stellenwert ein. So sind effektive Methoden notwendig, um Kontaminationen von Lebensmitteln mit pathogenen Organismen und deren Metabolite zu detektieren. Beispielsweise haben Verunreinigungen von *Salmonella* (Kwang *et al.*, 1996), *Yersinia* (Mollaret *et al.*, 1979), *Shigella* (Katz, 1986) und pathogenen *E. coli*-Stämmen in der Vergangenheit immer wieder zu Einzelerkrankungen bis hin zu Epidemien geführt.

Neben der Lebensmitteldiagnostik ist die Bioprozesskontrolle ein weiteres Einsatzgebiet der mikrobiellen Diagnostik. Zur Fermentationsüberwachung benötigt man analytische Methoden, die z. B. Aussagen über Fremdorganismen im Reaktionsraum zulassen.

Zur Analytik dienen in allen Bereichen dabei häufig klassische Kultivierungsverfahren. Proben werden dabei auf feste Nährböden bzw. in flüssigen Nährmedien kultiviert, um eine geringe Anzahl vorhandener Bakterien zu vermehren und anschließend nachzuweisen. Die Identifizierung erfolgt durch mikroskopische Untersuchungen, jedoch erlaubt diese Methode lediglich eine grobe Einteilung in Stäbchen, Kokken, Vibrionen (kommaförmig) und Spirillen (schraubenförmig). Die Gramfärbung (Power, 1988) und biochemische Methoden zur Stoffwechseluntersuchung dienen wie serologische Tests zur weiteren Eingrenzung. Letztere nutzen spezifische Antiseren, die zur makroskopisch sichtbaren Agglutination der Bakterien führt (Würzer, 1998).

Erst seit der Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (PCR, s. Kap. I. 5.1.) steht eine hochspezifische Analysenmethode zur Verfügung, die eine schnelle Unterscheidung zwischen verschiedenen Bakterienarten zuläßt. Wichtige Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist allerdings die Kenntnis einer organismenspezifischen Sequenz innerhalb der DNA

(Reviews in: Gannon, 1994 und Giessendorf *et al.*, 1996). Die PCR produziert bei Anwesenheit des gesuchten Bakteriums, das die Primersequenz enthält, ein vervielfältigtes Stück DNA (Amplikon), das gelelektrophoretisch nachgewiesen werden kann.

Die Analysenzeit reduziert sich von einigen Tagen (für Kultivierung und Identifikation) auf wenige Stunden.

Um den Nutzen optischer Biosensoren für die Detektion spezifischer Bakterien zu evaluieren, wurde in dieser Arbeit das Bakterium *E. coli* DH5 α ausgewählt. Der Organismus war charakterisiert durch das Plasmid pUC 19, welches in hoher Kopienzahl pro Zelle vorlag (ca. 500-700 Plasmide, Lottspeich *et al.*, 1998 und Maniatis *et al.*, 1987). Abbildung 2.19. zeigt ein Schema der ringförmigen DNA, die 2686 bp lang ist :

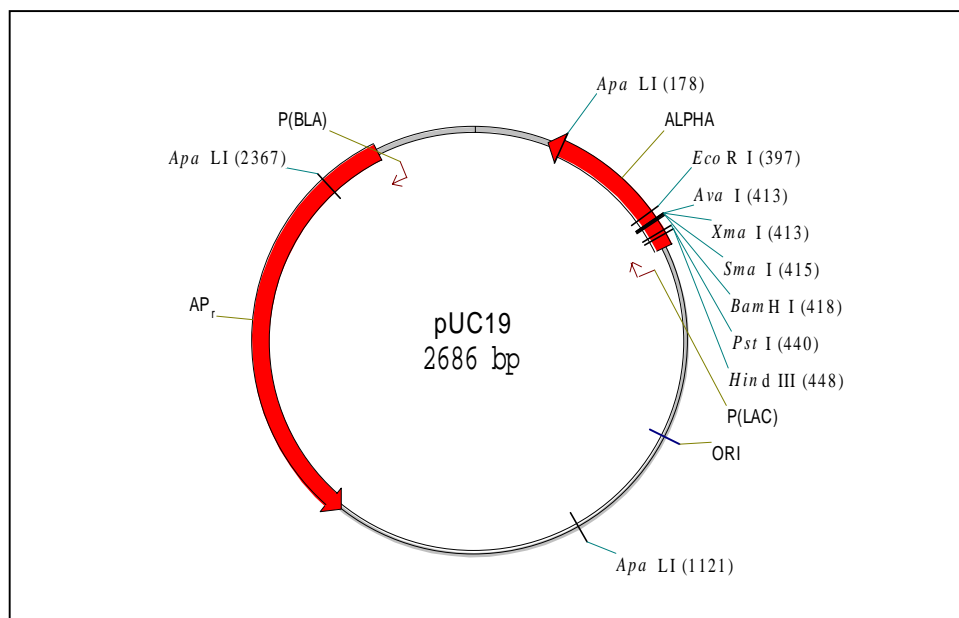


Abb. 2.19. : Schematische Darstellung des Plasmids pUC19. Die ausgewählte Amplifikations-Region lag zwischen den Basen-Positionen 375-500.

Das Amplikon, das mittels PCR vervielfältigt wurde, hatte eine Länge von 125 bp. Die Sequenz des DNA-Segments einschließlich der verwendeten Primer ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt :

5' – GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCC
TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCCTGTTGTGAAATTGTTATCCGCT – 3'

Abb. 2.20.: DNA-Sequenz des 125 bp langen Amplikons. Dargestellt wurde nur ein Strang der synthetisierten DNA. Unterstrichen wiedergegeben wurde die Position der beiden Primer Forward und Reverse.

2.3.2. Isolierung des Plasmids pUC 19 aus Stamm *E.coli* DH5 α

Anzucht des Bakteriums

Der als Glycerinstamm gelagerte *E.coli* Stamm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Mahavir Singh, TU Braunschweig) wurde auf mehreren Agarplatten ausgestrichen und bei 30°C ü. N. inkubiert.

Zur Herstellung der Vorkultur wurden je 1 bis 2 Kolonien auf 12 ml LB-Medium überimpft, mit 12 μ l Ampicillin –Lösung (100 μ g/ml) versetzt und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Die Hauptkultur wurde durch Zugabe von 10 ml bewachsener Vorkultur auf 1l LB-Medium gewonnen. Der Inkubationsbedingungen entsprachen mit 37°C (ü. N.) den Vorkulturen.

Isolierung des Plasmids

Die Hauptkultur wurde für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 12 ml Tris HCl (50 mM, 10 mM EDTA, 100 μ g RNase A/ml, pH 8.0) aufgenommen. Unter Zugabe von 12 ml NaOH (200 mM, 1% SDS) und anschließendem leichtem Schütteln für 5 min erfolgte der Aufbruch der Zellmembran. 12 ml 2.8 M Kaliumacetat-Lösung (pH 5.1) wurden langsam zugeführt und das verschlossene Röhrchen im Anschluß daran leicht umgeschwenkt, bis eine homogene Lösung entstand. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde bei 12.000g (4°C) abzentrifugiert

Unterdessen wurde eine Nucleobond®-AX 500-Säule (Clontech, Palo Alto, USA) mit 5 ml 100 mM Tris (15 % Ethanol, 900 mM KCl, mit H₃PO₄ auf pH 6.3 eingestellt) equilibriert. Das Anionenaustauschermaterial bestand aus hydrophilen Silica-Beads, die über sekundäre Aminogruppen mit den negativen Phosphatresten der DNA in Wechselwirkung treten können. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig vom SDS-Präzipitat abgesogen und auf die Säule aufgetragen. Auf zwei Waschschrte mit je 12 ml 100 mM Tris (15 % Ethanol, 1150

mM KCl, mit H_3PO_4 auf pH 6.3) folgte ein Elutionsschritt, wozu 6 ml 100 mM Tris (15 % Ethanol, 1000 mM KCl, mit H_3PO_4 auf pH 6.3) auf die Säule aufgetragen wurden.

Nach der Aufreinigung der Plasmide wurde die DNA durch Zusatz von Isopropanol (70 % des Ausgangsvolumens) präzipitiert und anschließend bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in dest. Wasser aufgenommen.

2.4.3. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von *E. coli* DH5 α

Die PCR wurde mittels GeneAmp[®]-Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) bzw. TaKaRa[®]-Kit (Boehringer-Ingelheim, Heidelberg) durchgeführt, wobei sich die 100 μl Reaktionslösung aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte :

Volumen	Komponente
1 μl	AmpliTaq DNA Polymerase (5U)
je 1 μl	dATP, dGTP, dCTP und dTTP (je 2.5 nmol)
10 μl	10xPCR-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)
1 μl	Reverse Primer (10-100 pmol)
1 μl	Forward Primer (10-100 pmol)
1 ng	DNA-Template (pUC 19 in dest. H_2O)
	\Rightarrow mit dest. H_2O auf 100 μl auffüllen.

Tab. 2.2. : Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches.

Primersequenzen :

- Forward-Primer

5'-GTTGTAAAACGACGGCCA-3'

Berechnete Schmelztemperatur $T_m = 49.1^\circ\text{C}$ (für Salzkonzentration: 50 mM)

(nach Gleichung 1)

- Reverse-Primer

5'-AGCGGATAACAATTTACAC-3'

Berechnete Schmelztemperatur $T_m = 46.8^\circ\text{C}$ (für Salzkonzentration: 50 mM)

Zur Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler der Firma Landgraf, Hannover mit dem folgenden Programm verwendet:

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1. Denaturierung	95	240
2. Denaturierung	95	30
3. Primerannealing	48-62	30
4. Elongation	72	30

Anzahl der Zyklen : 25-30

Ein Zyklus entspricht : Schritt 2-4, anschließend zurück zu Schritt 2.

Tab. 2.3. : Ablaufschema der PCR.

Im ersten Schritt erfolgt die *Denaturierung* der Template-DNA, anschließend lagern sich die Primer bei den vorgewählten Temperaturen (s. Kap. I. 5.1.1.) an. Die DNA-Polymerase synthetisiert den neuen Strang an ihrem Temperaturoptimum von 72°C in der *Elongationsphase*.

2.3.4. Asymmetrische PCR

Die Durchführung einer asymmetrischen PCR führt zur einer gezielten Vervielfachung eines Einzelstranges (s. Kap. I. 5.1.2.). Dabei wurden zwei Ansätze gewählt, wobei im ersten, einem Zwei-Stufen-Prozeß, als Template symmetrisches PCR-Produkt benötigt wird. Die erste Stufe nutzte zwei Primer, verlief also nach dem normalen PCR-Schema, während die zweite Stufe das Produkt der ersten Stufe nutzte, jedoch durch Zugabe nur eines Primers gezielt nur einen Strang verlängerte :

Volumen	Komponente
1 µl	AmpliTaQ DNA Polymerase (5U)
je 1 µl	dATP, dGTP, dCTP und dTTP (je 2.5 nmol)
10 µl	10xPCR-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)
1 µl	Reverse Primer (10-100 pmol)
10 µl	Symmetrisches PCR-Produkt
	DNA-Template (pUC 19 in dest. H ₂ O)
	⇒ mit dest. H ₂ O auf 100 µl auffüllen.

Tab. 2.4. : Zwei-Stufen Prozess: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die asymmetrische PCR.

Im zweiten Ansatz verlief die asymmetrische PCR in einer Stufe, d. h. als Template wurde Plasmid eingesetzt. Das Besondere an dieser Reaktion war der unterschiedliche Gehalt an Forward- und Reverse-Primer. Bedingt durch das Verhältnisses der beiden Moleküle zueinander erfolgte zuerst eine symmetrische PCR, bis ein Primer verbraucht war, so daß in der folgenden Reaktion nur noch ein Einzelstrang vervielfältigt wurde:

Volumen	Komponente
1 µl	AmpliTaq DNA Polymerase (5U)
je 1 µl	dATP, dGTP, dCTP und dTTP (je 2.5 nmol)
10 µl	10xPCR-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)
1 µl	Reverse Primer (100 pmol)
1 µl	Forward Primer (1-10 pmol)
1 ng	DNA-Template (pUC 19 in dest. H ₂ O)
	⇒ mit dest. H ₂ O auf 100 µl auffüllen.

Tab. 2.5. : Ein-Stufen-Prozess: Im Fettdruck symbolisiert, das unterschiedliche Konzentrationsverhältnis zwischen Reverse- und Forward-Primer.

Die Temperaturzyklen entsprachen dabei jeweils den in Tabelle 2.3. dokumentierten Werten.

2.3.5. Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte bzw. der Plasmid-DNA wurde ein 1.5 – 2%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde 1.5 bzw. 2 g Agarose (DNA-grade) in 100 ml 1xTBE-Puffer mehrfach aufgeköcht, bis die gesamte Agarose gelöst war. Nach einem Abkühlen auf ca. 65°C wurde die Lösung in eine vorbereitete Form gegossen. Ein Kamm sorgte dafür, daß im erstarrten Gel Taschen entstanden, die zur Auftragung der Nukleinsäureproben benutzt werden konnten. Anschließend wurde das Gel aus der Form entnommen und in eine mit 1xTBE gefüllte Gelkammer eingelegt, so daß der Puffer das Agarosegel gerade bedeckte.

Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Proben, die vorab mit je 2 µl DNA-Gelauftragspuffer (s. Kap. I. 1.4.) versetzt waren. Anschließend wurde eine Spannung von 70 V angelegt, daß Gel daraufhin entnommen und in einer Lösung aus 10 µl SYBR Gold in 100 ml 1xTBE-Puffer 30 min lang geschwenkt.

Dokumentiert wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) bei Verwendung einer Videokamera.

2.4. Methoden der RNA-Analytik

Bevor versucht werden sollte, den Nutzen optischer Biosensoren auf dem Gebiet der RNA-Analytik abzuschätzen, wurden begleitend herkömmliche Methoden eingesetzt, die als Standard für einen Vergleich herangezogen werden müssen (Krieg *et al.*, 1996 und Maniatis *et al.*, 1989).

Das gezeigte Schema (Abb. 2.21.) verdeutlicht die einzelnen Schritte, um eine spezifische mRNA mit Hilfe herkömmlicher radioaktiver Sonden nachzuweisen. Es macht außerdem den möglichen Nutzen von Biosensorsystemen deutlich, die einige Schritte unnötig machen könnten (Cheng *et al.*, 1998). Zudem könnten die in der Genexpressionsanalytik üblichen radioaktiven Arbeitsmethoden ersetzt werden, die aufgrund gesundheitlich schädlicher Strahlungsbelastungen und Entsorgungsfragen zunehmend kritisiert werden.

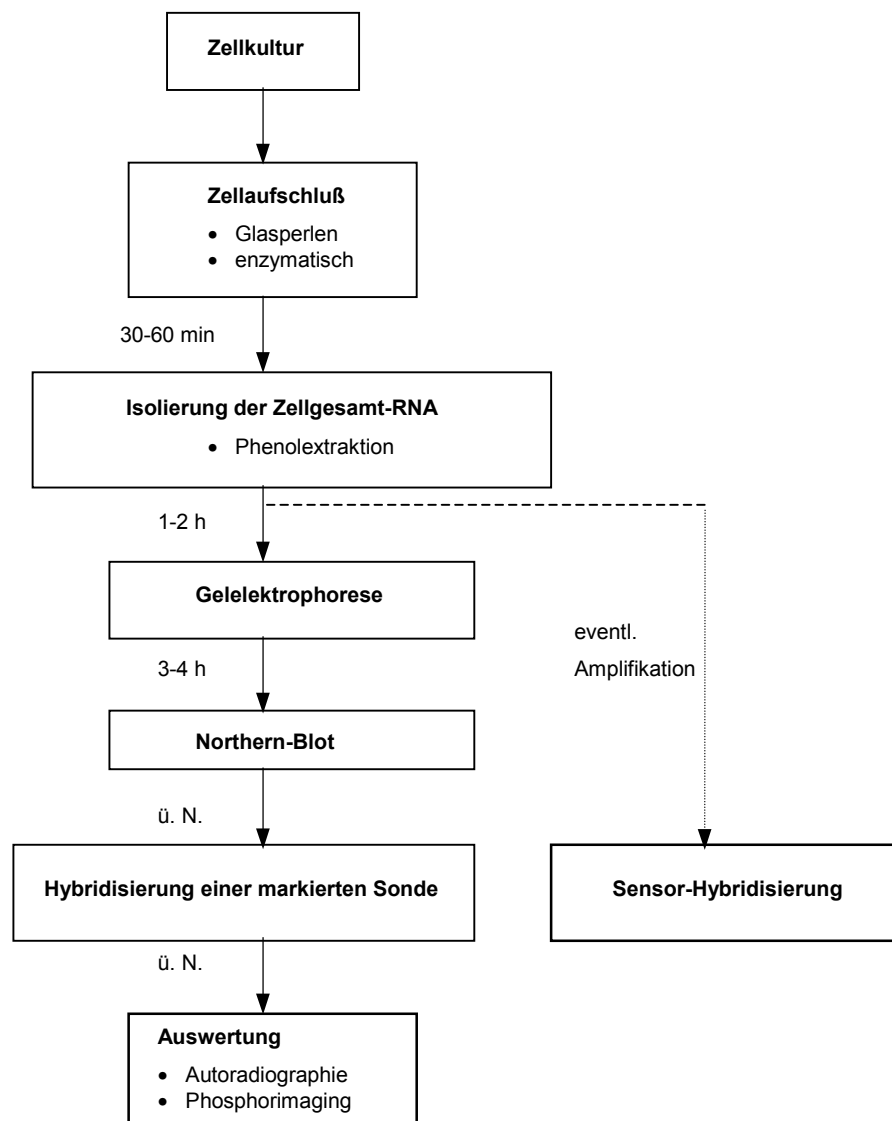


Abb. 2.26.: Übersicht und Zeitanalyse klassischer RNA-Analytik (linker Ast) sowie Ansatzpunkte von automatisierten Sensorsystemen (rechter Ast).

2.4.1. Hefekultivierung

Zur Zellanzucht wurde *Saccharomyces cerevisiae* des Stammes 20B12 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Joop van den Heuvel, GBF) auf YEPD-Agarplatten ausgestrichen, 2 Tage bei 30°C inkubiert, und anschließend eine 20 ml Vorkultur YEPD-Medium beimpft. Nach ü. N. Inkubation (30°C/Schütteln bei 180 U/min) wurde 100 µl der Kultur für die Animpfung der Hauptkultur verwendet, von der 500 ml bei einer OD₆₀₀ von 1 bzw. 1.45 für die Isolation der Total-RNA verwendet wurden.

2.4.2. Zellaufschluß und Isolierung der Total-RNA

2.4.2.1. Grundlagen

Der erste Schritt beim Nachweis der Expression eines bestimmten Gens ist der *Zellaufschluß*, der bei Hefezellen enzymatisch durch Zymolase (Baldwin *et al.*, 1990) oder mit Hilfe einer „French-Press“ (Lottspeich *et al.*, 1998) erfolgen kann. Dabei wird eine Zellsuspension unter hohem Druck durch eine enge Öffnung gepreßt, so daß die Zellen zerplatzen.

In dieser Arbeit wurden jedoch feine Glaskugeln verwendet, die durch auftretende Scherkräfte bei starker Vibration der Probe eine mechanische Zerstörung der Zellwand erreichen.

Um die Aktivität der stabilen intrinsischen RNasen zu verringern, wird der Zellaufschluß gekühlt und sofort mit gepuffertem Phenol (pH 7.5-8.0) vermischt. Phenol denaturiert die Proteine, die dann in der Interphase zwischen Nukleinsäurelösung und Phenolphase ausfallen. Zentrifugation erleichtert die Abtrennung der Nukleinsäurelösung von der organischen und der Interphase. Das überschüssige Phenol wird durch mehrmaliges Waschen mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung aus der Nukleinsäurelösung entfernt. Durch Zugabe einer hochkonzentrierten LiCl-Salzlösung bei -20°C kann die Nukleinsäure dann gefällt und isoliert werden.

Zur Aufreinigung der Total-RNA aus Bäckerhefe wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, wobei sowohl die klassisch-phenolische Variante als auch das Aufreinigungskit *RNAeasy* der Firma Qiagen benutzt wurden. Die Isolierung der Total-RNA aus der Hefe *Pichia Pastoris* erfolgte mit Hilfe der phenolischen Methode.

2.4.2.2. Phenolische Methode der Total-RNA-Isolierung

Die Hefezellen wurden für 5 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert, dekantiert und in 2.5 ml eiskaltem LETS-Puffer resuspendiert. Folgend wurden 20 g Glasbeads (Ø 0.5 mm) in 3 ml phenolischem LETS-Puffer dazugegeben und mehrere Minuten unter Kühlung geschüttelt (Vortex), um einen kompletten Zellaufschluß zu erhalten. Alternativ dazu wurde ein Brown-Shaker verwendet, in dem Zellextrakt und Glasbeads in speziellen Glasbehältern für 30 s unter CO₂-Kühlung stark vibrierten und dadurch Zellmembranbruch erzeugt wurde.

Nach erfolgtem Aufschluß wurden weitere 5 ml eiskalter LETS-Puffer hinzugefügt und leicht geschüttelt. Eine 5-minütige Zentrifugation bei 8000 rpm ermöglichte die leichte Trennung der wäßrigen von der phenolischen Phase, die abgezogen und zweimal mit Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) gewaschen wurde.

Anschließend wurde 5 M LiCl-Lösung (1/10 des Gesamtvolumens) dazugegeben und für 3h bei -20°C stengelassen. Die ausgefallene RNA konnte isoliert und in RNase-freiem Wasser aufgenommen werden.

2.4.2.3. RNA-Isolation mit Hilfe des RNAeasy Kits

30 mg Hefezellen wurden in 500 µl Lyse-Puffer (QRL1) gelöst und 0.5 g Glasbeads dazugegeben. Die Probe wurde unter Kühlung 3 min stark geschüttelt (Vortex), kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Beads wurden mit 250 µl QRL1 gewaschen, der Überstand ebenfalls abgezogen und mit dem ersten vereinigt. Nach Zugabe von 9 ml Bindungspuffer QRV2 zum Überstand wurde 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert, um zu verhindern, daß das Säulenmaterial verstopft. Die anschließende Anionentauschersäule wurde mit 3 ml QRE-Puffer equilibriert und mit dem Überstand der Zentrifugation beladen.

2.4.3. Gelelektrophorese der RNA

2.4.3.1. Grundlagen

Die Agarose-Gelelektrophorese für die RNA weist einige Unterschiede zur Elektrophorese von DNA auf (s. Kap. II 2.3.5.).

Meist werden einzelsträngige RNA Moleküle unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, da sie durch intra- bzw. intermolekularer Basenpaarung Sekundärstrukturen ausbilden können (Martin *et al.*, 1996). DNA dagegen wird unter nativen, nicht-denaturierenden Bedingungen getrennt.

Als Denaturierungsmittel für RNA kommen Glyoxal, Formaldehyd und Methylquecksilberhydroxid zu Einsatz, wobei das letztere wegen hoher Giftigkeit nicht mehr häufig verwendet wird. Die denaturierende Wirkung von Formaldehyd, das sowohl dem Gel als auch dem Gelpuffer zugesetzt wird, beruht auf der Bildung Schiff'scher Basen mit den Aminogruppen von Guanin, Cytosin und Adenin. Dadurch wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken effektiv unterbunden, so daß sich keine Sekundärstruktur entwickeln kann.

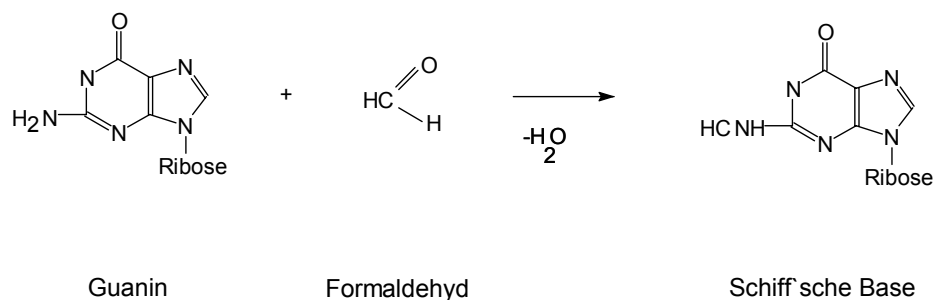


Abb. 2.22. : Denaturierende Wirkung von Formaldehyd durch die Ausbildung von Schiff'schen Basen.

Glyoxal wird dagegen schon vor dem Auftrag der Proben auf das Gel in einmolarer Konzentration mit der RNA inkubiert, wobei es kovalent mit Guanin-Basen reagiert (Martin, 1996).

Um die Banden der aufgetretenen RNA verfolgen zu können, wird z. B. Ethidiumbromid verwendet, ein fluoreszierender Interkalator, der Licht zwischen 254 und 366 nm absorbiert und im rot-orangen Wellenlängenbereich (590 nm) emittiert (s. Kap. I. 4.5. und Lottspeich *et al.*, 1998).

2.4.3.2. Durchführung der RNA-Gelelektrophorese

Zur Prävention eines vorzeitigen RNA-Abbaus wurde die Gelelektrophorese-Apparatur mit AntiRNase-Spray besprüht und gründlich mit RNase-freiem Wasser gereinigt. Das verwendete Formaldehyd-Agarosegel hatte folgende Zusammensetzung :

1.5%-Gel : 3g Agarose (RNase-frei)
 200 ml dest. H₂O
 20 ml 10x FA-Puffer
 3.6 ml Formaldehyd (37%ig)
 1–2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Das Gel wurde vor der Auftragung für 30 min in 1 x FA-Laufpuffer equilibriert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an low, high und Total-RNA beschickt. Bei 100 V/h wurde für ca. 3h aufgetrennt.

2.4.4. Northern Blot

2.4.4.1. Grundlagen

Um die separierten Nukleinsäuren weiter untersuchen zu können, werden sie aus dem Agarosegel auf eine Membran übertragen („Blotten“). Neben den herkömmlichen Nitrocellulosemembranen werden heute hauptsächlich stabile Nylonmembran benutzt, die positiv geladen oder ungeladen erhältlich sind. Desweiteren können sie modifizierte Oberflächen besitzen, die eine Kopplung der Nukleinsäure unter Einwirkung von ultravioletter Strahlung ermöglichen. Zum Beispiel werden Thyminreste dabei kovalent mit Aminofunktionen auf der Membran verknüpft.

Als Verfahren des Blottens wurde in dieser Arbeit das einfache sog. Kapillarblotten angewendet, wobei Blot-Puffer durch Auflegen eines Filterpapiers und einer dicken Schicht aus Papiertüchern durch das Gel und die Membran gesaugt wird (s. Abb. 2.23.).

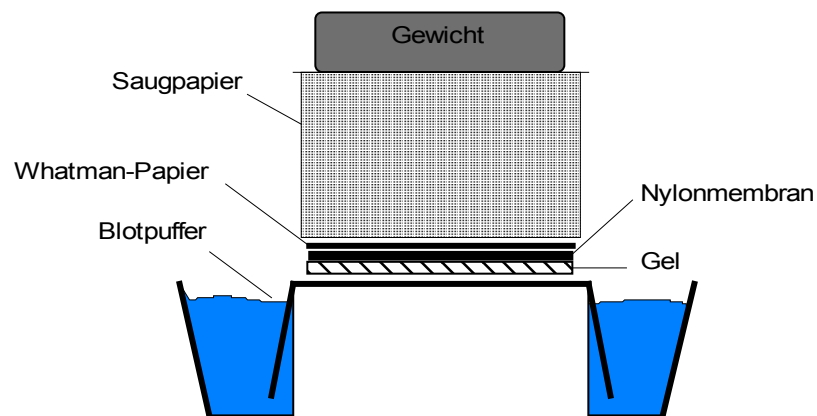


Abb. 2.23.: Kapillarblot von RNA. Schematischer Aufbau.

Andere Methoden, wie das Elektroblothen, wo die Nukleinsäuren durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf die auf der Anodenseite angebrachte Membran wandern, werden vor allem bei Polyacrylamidgelen angewendet. Sie verkürzen den Zeitbedarf von 12 - 18 h auf wenige Stunden, benötigen jedoch einen höheren apparativen Aufwand.

Um die für ein bestimmtes Protein relevante mRNA zu identifizieren, d.h. zu überprüfen ob das Gen exprimiert wurde, wird mit einer spezifischen kurzen Oligonukleotid-Sonde auf dem Blot hybridisiert. Die Sonde, die meist zwischen 20 bis 30 bp lang ist, wird durch eine Phosphorylierungsreaktion mit Hilfe einer Kinase radioaktiv markiert. Die sog. T4 Polynukleotid-Kinase katalysiert die Bindung des γ -ständigen Phosphats aus ATP an das 5'-Hydroxylende der benötigten Sonde (Richardson *et al.*, 1981).

2.4.4.2. Durchführung des Northern-Blots

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarkräften aus dem Agarosegel auf eine Hybond-Nylonmembran übertragen (Kapillarblot). Als Blotpuffer wurde 20xSSC, pH 7.0 benutzt, mit dem die Nukleinsäure ü. N. bei RT geblottet wurde. Anschließend wurde die Blotmembran in einem UV-Belichter (Stratagene, Heidelberg) für 1 min mit Licht der Wellenlänge 254 nm belichtet, das ein chemisches Crosslinking zwischen der Nylonmembran und der Nukleinsäure bewirkt. Die Stabilität der fixierten Moleküle sollte dadurch erhöht werden (Lottspeich *et al.*, 1998). Der Blot war bei 4 °C für mehrere Monate lagerbar.

2.4.4.3. Präparation radioaktiv gelabelter Oligonukleotide

Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte durch Phosphorylierung mit γ - ^{32}P -ATP am 5'-Hydroxylende von Nukleinsäuren katalysiert durch Polynukleotid-Kinase. Die Reaktion wurde für 1h bei 37°C durchgeführt. Folgende Konzentrationen wurden dabei eingesetzt :

1 μl	:	γ - ^{32}P -ATP
1 μl	:	100 pmol entsprechendes Oligo
2 μl	:	10 x Kinase Puffer
1.2 μl	:	100 mM DTT
1 μl	:	T4 Polynucleotidkinase
13.8 μl	:	dest. H_2O
<hr/>		
20 μl		Reaktionsvolumen

Zur Inaktivierung der Kinaseaktivität wurde die Mischung für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Um freies radioaktives ATP aus der Probenmischung von den gelabelten Oligonukleotiden zu trennen, wurden 20 μl des Reaktionsgemisches auf eine Nap-5-(Sephadex G-25, Pharmacia) Gelfiltrationssäule aufgetragen. Dazu wurde die Säule mit 4x je 5ml Tris-HCl-Puffer, (50 mM, 1mM EDTA, pH 8) equilibriert. Anschließend wurde die Sonde, versetzt mit 1 μl denaturierter Herings-Sperma-DNA und 2 μl Dextranblau, auf die Säule gegeben und mit 250

µl Tris-HCl-Puffer in Teströhrchen eluiert. Zur Quantifizierung der Radioaktivität wurden jeweils 10 µl Probe pro Teströhrchen zusammen mit je 1 ml Szintillationsflüssigkeit in geeigneten Szintillationsgefäßen in einem Szintillationszähler vermessen.

2.4.4.4. Hybridisierungsexperimente mit membrangebundener RNA

Um unspezifische Bindungen der Sonde und u. U. vorhandener freier radioaktiver Nukleotide an die Nylonmembran zu vermeiden, wurde mit polymeren Substanzen abgesättigt („prehybridisiert“):

- **Prehybridisierung des Blots**

Der Blot wurde für 2 bis 4 h mit 25 bzw. 50 ml Prehybridisierungspuffer in einem Rollinkubator (Stratagene, Heidelberg) bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert. Der Puffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 15 ml : 6 x SSC (oder entsprechend modifizierte Salzkonzentration)
- 2.5 ml : 100 x Denhardts' Reagenz
- 2.5 ml : 10%ige SDS-Lösung
- 250 µl : Hering-Sperma-DNA(10 µg/µl), 2 min bei 95°C denaturiert

- **Hybridisierung und Waschen**

Die Hybridisierung der markierten Sonde mit der geblotteten RNA erfolgte durch Zugabe der Sonde und Inkubation über Nacht.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Blot mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählers vermessen. Das Waschen der Membranen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen (zusätzlich 0.1% SDS), um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wurde die verbleibende Radioaktivität auf der Membran vermessen. Der Blot wurde nach Abschluß des Spülens (2-4 Spülschritte) in Frapanfolie fixiert und mit Hilfe des Phosphorimagers untersucht.

2.4.5. Verwendung von Magnetpartikeln zur Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.4.5.1. Grundlagen

Separationen mit Hilfe von Magnetpartikeln werden in der Biologie und Biotechnologie in den letzten Jahren zunehmend häufiger angewendet (Haukanes *et al.*, 1993). Magnetische Separationen basieren allgemein auf der Immobilisierung eines Rezeptormoleküls an die Oberfläche der Partikel. Derart modifizierte Beads können anschließend in Affinitätsassays eingesetzt werden.

Neben Isolierungen von Krebszellen aus dem humanem Knochenmark (zuerst beschrieben von: Treleaven *et al.*, 1984) und weiteren immunologischen Ansätzen (Bakterien in Blut bei: Yu *et al.*, 1998), werden auch Nukleinsäuren über Reaktionen an Magnetpartikel isoliert.

Beschrieben wurden bereits die Separation doppelsträngiger bzw. einzelsträngiger DNA (Davies *et al.*, 1998), Virus-mRNA (Albretsen *et al.*, 1990), Total-RNA und polyA⁺-mRNA (Hengerer *et al.*, 1993). Ausgenutzt wird bei letzterer Anwendung ein Schwanz aus ca. 100-200 Adenylsäureresten am 3'-Ende aller eukaryontischer mRNAs, dessen Funktion noch nicht völlig geklärt ist (diskutiert wird u.a. ein Schutzmechanismus gegen enzymatische Spaltung; Lehninger *et al.*, 1994 und Alberts *et al.*, 1995). Kommerziell erhältlich sind Oligo-T-Beads, die ca. 24 Thymidinreste tragen und spezifisch die polyadenylierte mRNA binden (Haukanes *et al.*, 1993).

Die angebotenen Magnetpartikel variieren in ihrer Größe hauptsächlich zwischen 0.5-10 µm und sind entweder unbehandelt oder mit chemisch modifizierbaren, kopplungsfähigen Gruppen (z. B. Carboxyl- oder Aminogruppen) oder mit Liganden (z. B. Oligo-T, Streptavidin, Protein A) vorbeschichtet.

In dieser Arbeit wurden Magnetpartikel benutzt, die eine kopplungsfähige Aminofunktion enthielten. Des weiteren kamen Beads zum Einsatz, welche mit einem 24 bp-langem Oligo-T-Schwanz verknüpft waren. Oligo-T-beads dienten zur Bindung von Hefe-mRNA, die am 3'-Ende einen polyA⁺-Label trägt.

Die Sonden-Oligonukleotide wurden zum einen über Avidin-Biotin-Wechselwirkungen immobilisiert, wobei das Avidin über Glutardialdehyd an die Bead-Oberfläche gekoppelt wurde. Zum anderen wurden phosphorylierte Oligonukleotide über ein Carbodiimid (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid, EDC) direkt kovalent an die Aminogruppen gekoppelt.

Hybridisierungsreaktionen an Filtern und Membranen verlaufen im Vergleich zu Reaktionen in-Lösung um das Zehn- bis Zwanzigfache langsamer (Lund *et al.*, 1988). Bei der Verwendung von nur einige Mikrometer großen Magnetpartikeln, die in Suspension vorliegen und als paramagnetische Teilchen nicht aneinander haften, erfolgt eine Hybridisierungsreaktion schneller als an der Festphase. Die Hybridisierungskinetik liegt zwischen der einer Hybridisierung in Lösung und der heterogener Reaktionen an einer Membran (Lund *et al.*, 1988). Durch schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten und leichte Abtrennbarkeit von anderen Lösungsbestandteilen könnten die Magnetpartikel für die geplante Aufreinigung von RNA in dieser Arbeit als optimale Vorstufe geeignet sein.

2.4.5.2. Präparation der Magnetpartikel

Bindung der Sonden über Biotin-Avidin

250 µl Magnetbead-Suspension (Marke *Biomag*, Paesel & Lorei, Frankfurt, ~ 12.5 mg beads, Durchmesser: 0,5 bis 1,5 µm), die eine mit Aminogruppen modifizierte Oberfläche besaßen, wurden durch Einwirkung eines Permanentmagneten separiert und dreimal mit dest. H₂O gewaschen. Zur Aktivierung der Oberfläche diente 0.5 ml 5%ige Glutardialdehyd-Lösung in dest. H₂O, die hinzugefügt und 3h auf einem Rotationstisch bewegt wurde. Anschließend wurden die Partikel 6 bis 8 mal mit 0.6xSSC gewaschen und separiert (nach: Günther, 1994). Zur Kopplung des Avidins wurden 4 mg Avidin in 500 µl PBS (80 mM, pH 7.6) zu den Beads gegeben und über Nacht bei RT rotiert, anschließend magnetisch separiert und gewaschen. Eine 15-minütige Inkubation mit 5 ml Glycinlösung (1M, pH 8) diente zur Absättigung der freien Aldehydgruppen. Nach fünfmaligem Waschen und Separieren wurden die Beads in 250 µl PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Zur Kopplung des Sonden-Oligonukleotids wurde zu 4 mg Beads das biotinylierte Oligonukleotid (10 nmol/100 µl) dazupipettiert, 45 min rotiert und anschließend mehrmals gewaschen, um ungebundenes Oligo zu entfernen. Abschließend wurden die Beads in 100 µl aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Bindung der Sonden über direkte Kopplung mit Hilfe von EDC

(nach: Ghosh *et al.*, 1987 und Kröger, 1998)

Abbildung 2.24. zeigt ein Reaktionsschema der Kopplung. Zuerst erfolgt eine enzymatische Phosphorylierung am 5'-Ende der zu koppelnden Sonde, anschließend erfolgt die EDC-vermittelte Bindung an die Aminogruppen der Magnetpartikel :

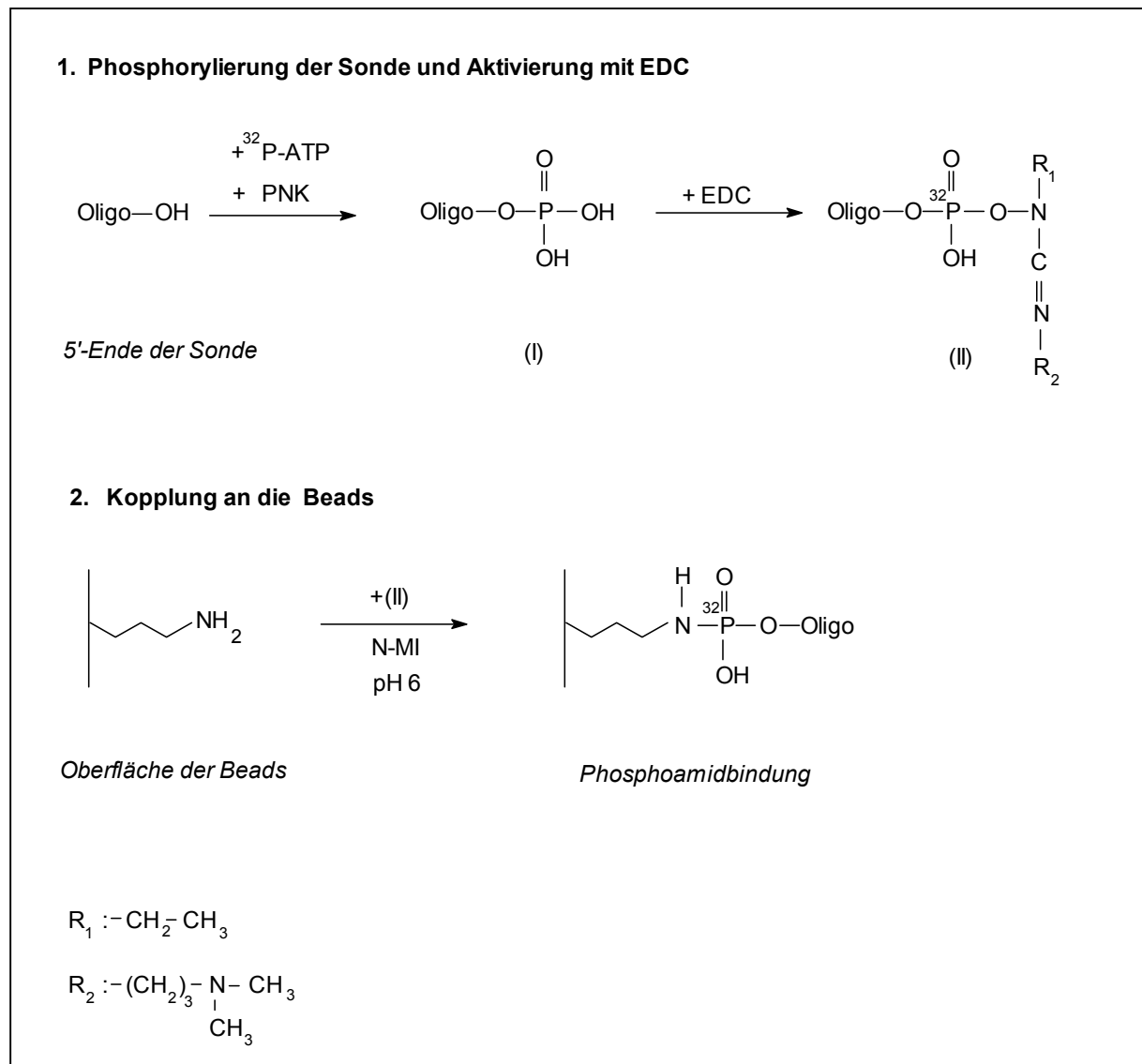


Abb.2.24. : Kopplung phosphorylierter Oligonukleotide an Magnetbeads bzw. CPG über EDC. Im ersten Schritt der Reaktion erfolgte die Phosphorylierung des Oligonukleotids mit Hilfe einer T4 Polynukleotidkinase (PNK) und Aktivierung mit dem Carbodiimid EDC. In 0.1 M N-Methylimidazol (N-MI) erfolgte anschließend die Kopplung an die Bead-Oberfläche unter Ausbildung einer Phosphoamidbindung.

Zur Durchführung der Kopplung wurde das Oligonukleotid RNA4 mit Hilfe einer Polynukleotid-Kinase und radioaktivem $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ am 5'-Ende phosphoryliert (s. Kap. II 2.4.4.3.). Anschließend wurden je 25 pmol der radioaktiven Sonden in einer Lösung aus 0.1 M N-Methylimidazol und EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid) für 1, 16, 22 und 40 h (RT, pH 6.0) mit je 1mg Magnetpartikel (Marke *Biomag*, s.o.) bzw. CPG (*controlled pore glass*, \varnothing ~70-150 μm) inkubiert. Anschließende Waschschrte mit 2xSSC (zweimal für je 1 min) und NaOH, pH 12 (einmal für 1 min) sollten unspezifisch gebundene Sonde entfernen.

2.4.5.3. Kompetitive Hybridisierung an Magnetpartikel

An Magnetpartikel (*Biomag*) gebundene Sonden sollten mit 1 pmol radioaktiv markiertem komplementären Strang hybridisiert werden, wobei steigende Konzentrationen von nicht-markiertem Oligonukleotid kompetiert.

Zur Prehybridisierung wurden zu 240 µl Avidin-beschichtete Magnetpartikelsuspension (ca. 9.6 mg Partikel) je 10 µl Herings-Sperma-DNA (10µg/ml) und 100xDenhardt gegeben und für 1.5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach Separation dekantiert und die Magnetbeads wiederum in 240 µl 2xSSC aufgenommen.

Zur Durchführung der Hybridisierung wurden je 0.15 – 1 mg Magnetpartikel mit 0-200 pmol markierter Oligonukleotide versetzt. Um das Haften von Magnetpartikeln an den Polypropylen-Behältern zu minimieren, wurde die Oberfläche mit Repel-Silan ES (2% Dimethyldichlorosilan in Octamethyl-cyclooctasilan, Pharmacia, Freiburg) behandelt. Dazu wurde 1 ml Silan eingefüllt, der Behälter entleert, 10-15 min angetrocknet und anschließend mit dest. H₂O gespült.

Zu den Proben wurden verschiedene Konzentrationen unmarkiertes Oligo, sowie je 1 µl Herings-Sperma-DNA und 100xDenhardt-Lösung gegeben und für 3h bzw. ü. N. bei RT stengelassen. Nach der Separation wurde jeweils der Überstand abgezogen, die Beads einmal mit 100 µl 2xSSC gewaschen. Überstand und Waschlösung wurden mit dem Szintillationszähler vermessen.

Die Magnetbeads wurden in 100 µl dest. H₂O aufgenommen, geschüttelt und für 2 min auf 95°C erhitzt. Die Suspension wurde abgezogen, die verbleibenden Partikel wurden wiederholt mit 100 µl dest. H₂O ausgewaschen, aufgenommen und ebenfalls vermessen.

Bestimmung der prozentual gebundenen Radioaktivität an Magnetbeads

Zur Charakterisierung der Hybridisierungs- bzw. Kopplungseffektivität von Oligonukleotiden an die Oberfläche von Magnetbeads wurde die prozentual gebundene Radioaktivität verwendet. Sie gibt an, wieviel Prozent der insgesamt eingesetzten radioaktiv markierten Oligonukleotide gebunden haben. Im Szintillationszähler wurden dafür jeweils die Überstände der Hybridisierungs- bzw. Kopplungsreaktionslösungen und der einzelnen Waschschritten vermessen, sowie die Restradioaktivität an den Beads. Daraus berechnet sich die Gesamtradioaktivität, die zur Berechnung der prozentual gebundenen Radioaktivität herangezogen wurde :

$$\text{Gesamtradioaktivität } \text{CPM}_{\text{Gesamt}} = \text{CPM}_{\text{Reaktionslösung}} + \text{CPM}_{\text{Waschlösung}} + \text{CPM}_{\text{Beads}} \quad (9)$$

$$\text{Prozentual gebundene Radioaktivität} = \frac{\text{CPM}_{\text{Beads}} \times 100}{\text{CPM}_{\text{Gesamt}}} \quad (10)$$

Mit : CPM = counts per minute

2.4.5.4. RNA-Aufreinigungsexperiment mittels Magnetbeads

Von den aufzukonzentrierenden RNA-Proben wurden 10, 5, 2.5 und 0.25 µg in 100 µl 0.6xSSC aufgenommen und mit jeweils 10 µl Magnetbeadsuspension versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bzw. ü. N. zur Hybridisierung (bei 28 °C) wurde magnetisch separiert und 2x je 1 min mit Hybridisierungspuffer gewaschen.

2.4.5.5. Isolation der mRNA aus Total-RNA

Zur Isolation der mRNA aus Total-RNA-Proben der Hefebatchkultivierung bzw. Fermentation wurden OligoT₂₄-Magnetbeads der Fa. Miltenyi verwendet. Die in der Folge angegebenen Pufferlösungen sind vom Hersteller nicht weiter spezifiziert worden :

Zu 1 µg Zellgesamt-RNA wurden 250 µl Magnetbeadsuspension pipettiert. Anschließend wurde die Suspension über eine Säule gegeben, die in einem Permanentmagneten integriert war. Die Magnetpartikel mit gebundener mRNA wurden auf der Säule fixiert und konnten mit einem Waschpuffer (3-4 Spülungen mit je 100 µl) von unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren und Proteinen befreit werden. Ein auf 65 °C vorgewärmter Elutionspuffer (1mM EDTA, 200 µl) eluierte die gebundene mRNA, die nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert werden konnte.

1. Atom-Kraftmikroskopie (AFM)

1.1. Einsatz des AFM zur Charakterisierung von Biosensoroberflächen

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendung von Biosensoren ist es, die Beschaffenheit der Oberfläche hinsichtlich Homogenität und molekularer Anordnung der Rezeptor-Biokomponente zu verstehen und zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde das AFM in der Arbeit als analytische Methode getestet.

Zwei zentrale Fragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen und werden in der Folge beschrieben :

- Kann man das Atom-Kraftmikroskop nutzen, um Aussagen über die Schichtdicke und Proteinanordnung von Avidin auf der Biosensoroberfläche zu gewinnen ?
- Wie verhalten sich Nukleinsäuren auf reinen und modifizierten Oxidschichten ?

Aus beiden Teiluntersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Arbeit mit den optischen Detektoren gezogen werden.

1.2. Untersuchungen zur Bindungseigenschaft von DNA an modifizierte Träger mit Hilfe des AFM

1.2.1. Variation der Immobilisierungsmethoden

Als Unterlage für die Immobilisierung des Plasmids wurde Mica verwendet, da es aufgrund einer extrem glatten Oberfläche optimale Eigenschaften für die Visualisierung besitzt.

Das Plasmid wurde in Wasser gelöst und auf reinem, APTS-silanisiertem und auf mit Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} -haltigem Puffer vorinkubierten Mica aufgebracht. Desweiteren wurde das Plasmid in einem Mg^{2+} -Ionen haltigen Puffer inkubiert.

Die folgenden Abbildungen illustrieren unterschiedliche Trocknungsprozesse für die DNA-Proben auf unbehandeltem Mica. Bei der linken Darstellung wurde ein 2 μ l großer Tropfen einer DNA-Lösung (25 ng Plasmid) bei 80 °C, in der rechten bei RT getrocknet. Deutlich wurde die Fixierung der Strukturen auf der Oberfläche bei Einwirkung der hohen Temperatur. Erfolgte die Trocknung dagegen langsam, kam es zur Agglomeration der Plasmide. Die Bewegung der DNA auf der Oberfläche folgte der Verdunstung des Wassertropfens.

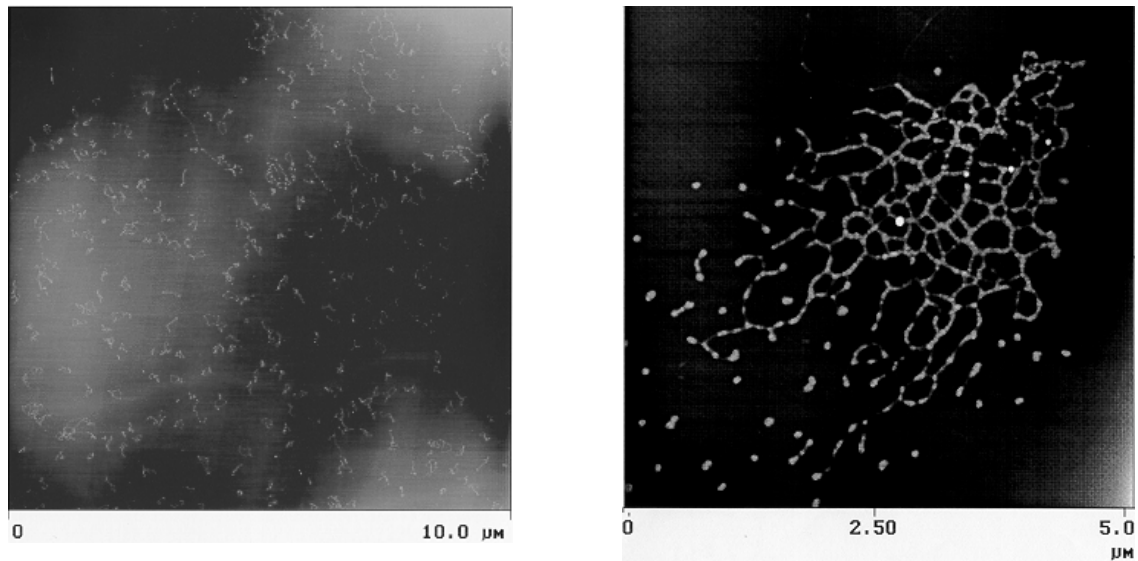


Abb. 3.1.: Die linke Abbildung zeigt die Plasmide pUC19 (25 ng in dest. H₂O) abgelagert auf Mica und getrocknet bei 80°C, während die rechte Abbildung Plasmide zeigt, die bei RT getrocknet wurden.

Frisch gespaltenes, anorganisches Mica besitzt eine schwach negativ geladene Oberfläche mit einer geringen Anzahl freier Hydroxylfunktionen (Lyubchenko *et al.*, 1997 und Bezanilla *et al.*, 1995). Nukleinsäuren sind aufgrund der hohen Anzahl an Phosphatgruppen stark negativ geladene Moleküle, so daß die negative Oberfläche keine stabile Bindung ermöglichte. Zur Verifikation dieser Annahme wurde der Plasmidtropfen auf Mica nach 30 min Inkubation intensiv mit dest. H₂O gespült. In der anschließenden Messung war *kein* verbleibendes Plasmid mehr sichtbar.

Um die Bindungseigenschaften unter Verwendung divalenter Ionen zu ermitteln, wurde in Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} -haltigen Puffer gelagertes Mica benutzt. Die Ionen sollten die negative Oberflächenladung kompensieren und gleichzeitig als verbrückendes Teilchen elektrostatische Bindung der DNA ermöglichen (Hansma *et al.*, 1992). Abbildung 3.2. zeigt hauptsächlich spiralisierte Nukleinsäuren:

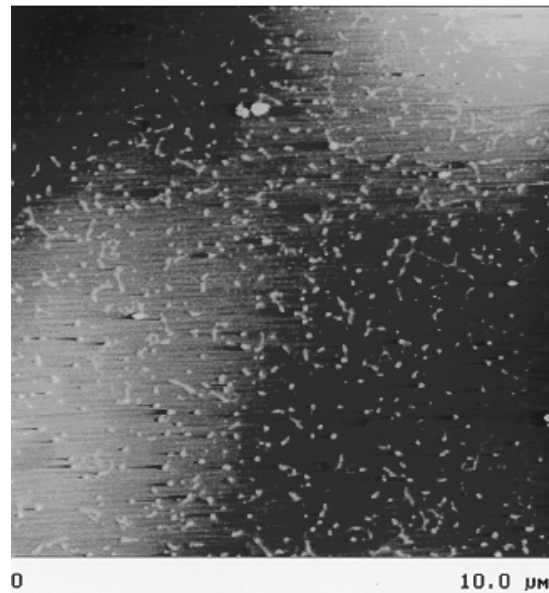


Abb. 3.2.: Plasmid pUC19 (25 ng in dest.H₂O) auf Ca^{2+} -vorinkubiertem Mica.

Ein Aufbringen von Plasmid, das in 10 mM Magnesiumnitrat gelöst war, erbrachte ein analoges Ergebnis zur Verwendung von vorbehandeltem Mica: stabile Bindung der DNA und vor allem koagulierte oder spiralisierte Strukturen.

Als letzte Immobilisierungsmethode wurde das Silanisierungsgens Aminopropyltriethoxysilan (APTS) verwendet (Hu *et al.*, 1996), das auch bei der Modifikation der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter benutzt wurde. Nach 5 minütiger Inkubationszeit einer 1%igen APTS-Lösung erhielt man eine glatte Oberfläche, die aufgrund des pK-Wertes für aliphatische Amine von 10.6 (Bezanilla *et al.*, 1995) im neutralen Bereich positiv geladen war. Die modifizierte Oberfläche sollte stabile elektrostatische Wechselwirkungen zwischen DNA und Aminofunktionen ermöglichen. Abbildung 3.3. zeigt ein entspanntes Plasmid, das auf silanisiertem Mica bindet.

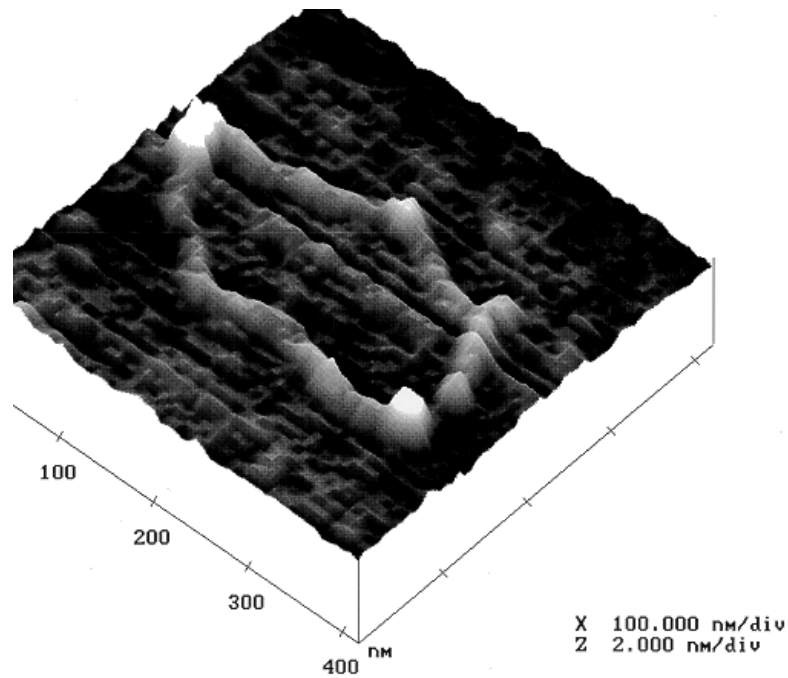


Abb. 3.3.: 3D-Darstellung des Plasmids pUC19 auf APTS-silanisiertem Mica (Inkubationszeit 5 min in dest. H₂O, anschließendes Spülen mit 200 ml dest. H₂O)

Die folgende Tabelle 3.1. vergleicht die Ergebnisse bezüglich Modifikation des Mica und erhaltener Strukturen:

Modifikation	Präparation	Resultate
roh	DNA-Inkubation 30min Trocknen : 80 °C	Entspannte Plasmide geringe Stabilität
roh	DNA-Inkubation 30min Trocknen : RT	Entspannte Plasmide, Agglomeration, geringe Stabilität
Ca ²⁺	DNA-Inkubation 30min Trocknen : 80 °C	Superspiralisierte Plasmide Stabile Bindung
Mg ²⁺	DNA-Inkubation 30min Trocknen : 80 °C	Entspannte & superspiralisierte Plasmide, stabile Bindung
Mg ²⁺ in der Lösung	DNA-Inkubation 3-30 min Trocknen : 80 °C, RT	Superspiralisierte Plasmide Stabile Bindung
APTS	DNA-Inkubation 3-30 min Trocknen : 80 °C, RT	primär entspannte Plasmide, stabile Bindung

Tab. 3.1.: Zusammenfassung der Immobilisierungsstrategien für DNA auf Mica.

Die APTS-silanisierte Mica-Oberfläche band Nukleinsäuren trotz der u. U. auftretenden teilweisen Dissoziation stabil in Bezug auf Spülschritte mit dest. Wasser. Die APTS-Silanisierung wurde angewendet, um die Bindung von DNA in Flüssigkeitsmessungen zu untersuchen. Dazu wurde eine Fließzelle auf die Micaoberfläche fixiert, die über eine Injektionskanüle mit Puffer bzw. Plasmidlösung befüllt werden konnte.

Das Ziel der Flüssigkeitsmessungen war eine Evaluierung der Abmessungen der DNA im Vergleich zur Messung im getrockneten Zustand. Außerdem sollte das Erscheinungsbild der DNA in Bezug auf Agglomerationen erfaßt werden.

Die folgende Abbildung illustriert die Visualisierung von Plasmiden in Wasser.

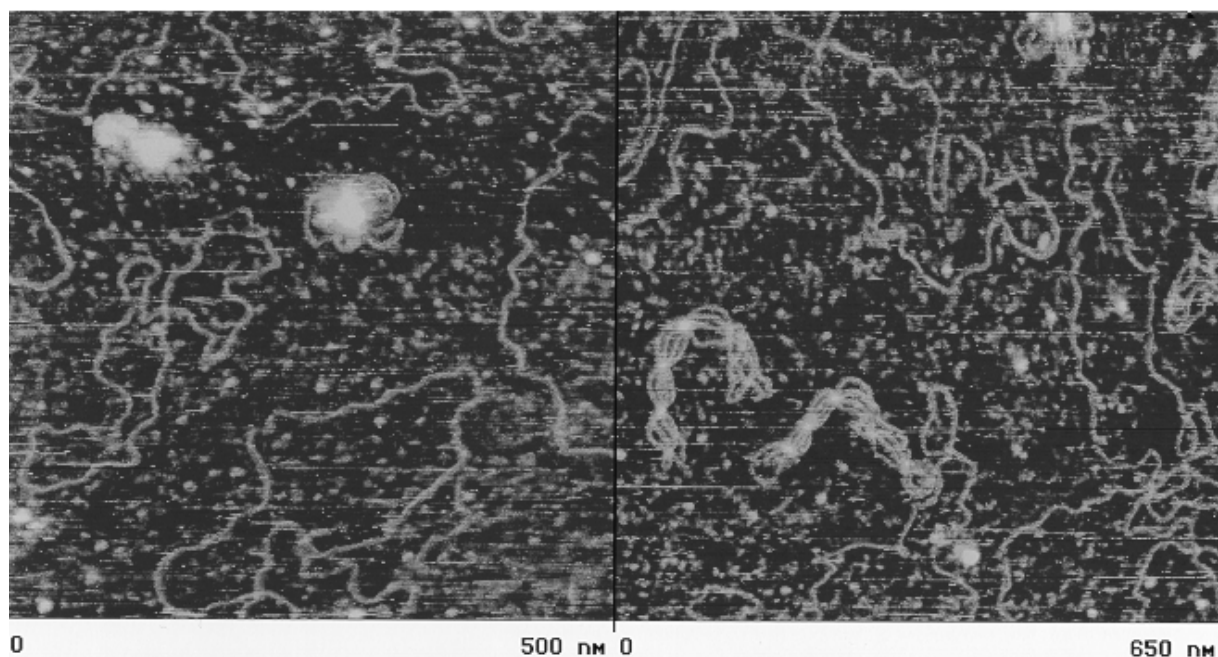


Abb. 3.4.: Messungen von Plasmiden in Flüssigkeit gebunden an APTS-silanisiertem Mica. pUC19 in verschiedenen Spiralisierungszuständen.

Die Aufnahme zeigt entspannte pUC19-Ringe, die neben sichel- und rosettenförmig spiralisierten Plasmiden binden.

1.2.2. Bestimmung der Abmessungen gebundener DNA

Abbildung 3.5. zeigt die Höhenbestimmung eines Plasmids, das an einer APTS-Oberfläche gebunden im getrockneten Zustand gemessen wurde.

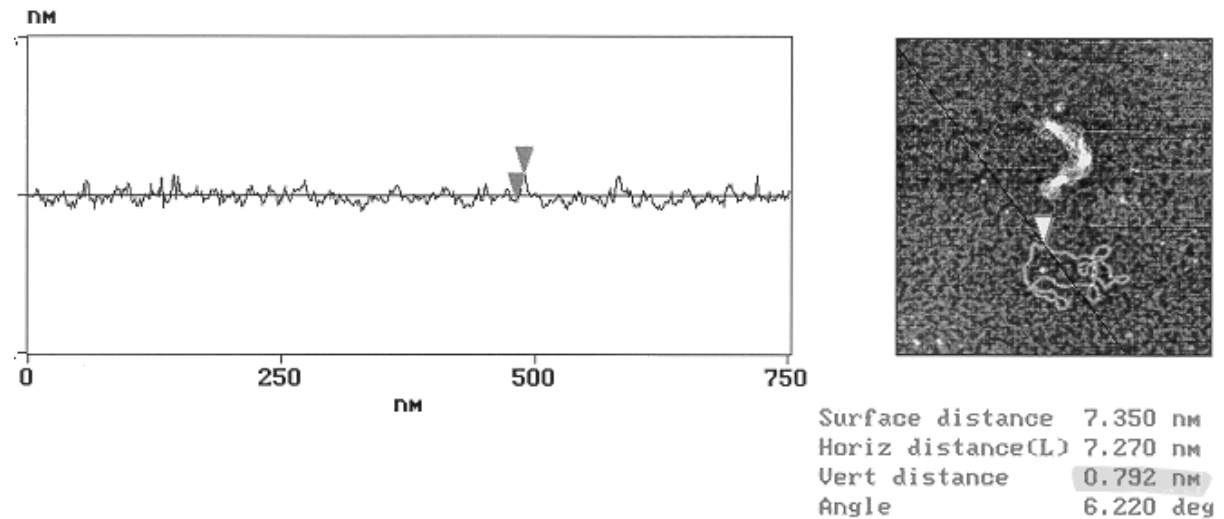


Abb. 3.5.: Höhenbestimmung von pUC19 mittels Sektionsanalyse.

Vergleicht man die Abmessungen der DNA in Flüssigkeit mit der im getrockneten Zustand, so wurde der folgende Zusammenhang festgestellt:

	Plasmid DNA Getrocknet bei 80°C	Plasmid DNA In Flüssigkeit	A-DNA*	B-DNA*
Höhe	0.7 ± 0.5 nm	1.7 ± 0.5 nm	\varnothing 2.55 nm	\varnothing 2.37 nm
Breite	7 ± 5 nm	12 ± 5 nm	\varnothing 2.55 nm	\varnothing 2.37 nm

Tab. 3.2.: Vergleich der experimentellen Daten für DNA-Ausdehnungen mit Literatur-werten (* aus: Stryer, 1996), die mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden. A- und B-Typus DNA entsprechen unterschiedlichen räumlichen Anordnungen.

1.2.3. Schlußfolgerungen :

- Reines anorganisches Mica, ein Mischoxid, bindet Nukleinsäuremoleküle; jedoch besitzen diese eine hohe Mobilität auf der Oberfläche. Die Verdunstung eines Probentropfens bewirkte eine Agglomeration der Plasmide.
- Divalente Ionen wie Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} förderten die Gesamt-Bindungsenergie der Nukleinsäuren durch elektrostatische Kräfte. Oberflächenfixierte Ionen dienten als überbrückende Teilchen zur Immobilisierung der DNA.

- Das Silan APTS veränderte die Mica-Oberfläche nach 5 min Reaktionszeit bereits so, daß Nukleinsäuremoleküle selbst unter Beobachtung in flüssiger Phase nicht weggespült wurden. Primäre Aminogruppen des Silans wechselwirkten mit den Phosphatgruppen, jedoch war die Mobilität der Moleküle auf der Oberfläche möglich.

1.3. Untersuchungen der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter mit dem AFM

1.3.1. Charakterisierung der rohen und proteinbedeckten Chips

Bevor verschiedene Immobilisierungsmethoden vom Protein Avidin auf den Lichtwellenleiter untersucht wurden, mußte die Ta₂O₅-Oberfläche im rohen und silanierten Zustand charakterisiert werden. Abbildung 3.6. zeigt einen 1 µm² großen Ausschnitt, die mit einer Scanrate von 1.5 Hz aufgenommen wurde.

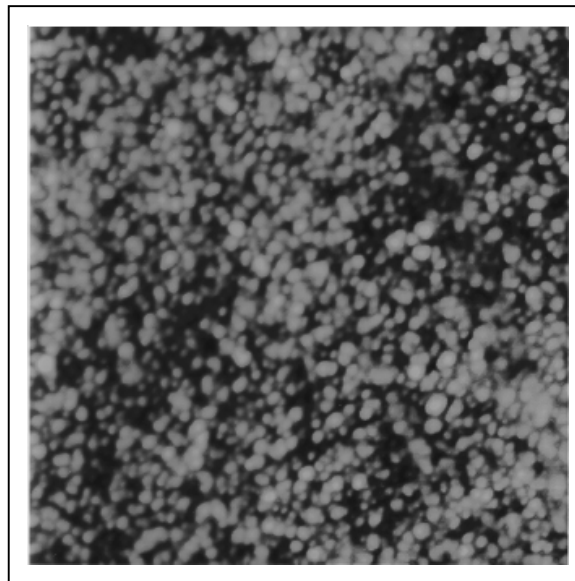


Abb. 3.6.: Rohe, unbehandelte Oberfläche eines Ta₂O₅-Lichtwellenleiters aufgenommen im Kontaktmodus (1 µm²-Ausschnitt).

Die ermittelte Durchschnittshöhe der gesputterten Oxidstrukturen lag bei 1.5 nm, mit einer berechneten mittleren Rauigkeit von 0.463 nm. Abbildung 3.7. zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Oberfläche.

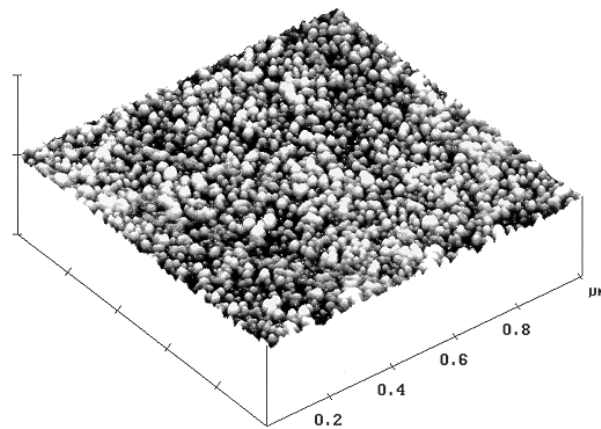


Abb. 3.7.: Rohe Ta_2O_5 -Lichtwellenleiteroberfläche. Gut zu erkennen sind in dieser $1\ \mu\text{m}^2$ großen dreidimensionalen Aufsicht die gesputterten Oxidstrukturen des Trägermaterials.

Nach erfolgter Silanisierung der Ta_2O_5 -Oberfläche mit Aminopropyltriethoxysilan (APTS) nahm die ermittelte Rauigkeit auf 0.61 nm geringfügig zu.

Abbildung 3.8. zeigt lineare, jedoch irreguläre Oberflächenstrukturen, die möglicherweise durch den Herstellungsprozeß bedingt sind (Heuberger, 1986 und Lukosz, 1983).

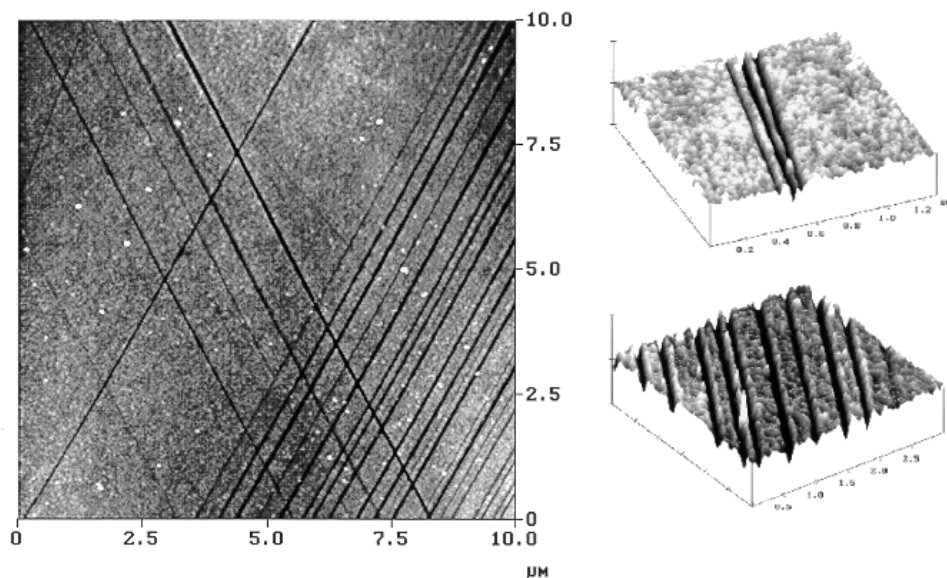


Abb. 3.8.: Oberflächenstruktur der unbehandelten Lichtwellenleiter: Die Oberflächen zeigen unregelmäßige Strukturen, die u.U. durch den Herstellungsprozeß bedingt sind.

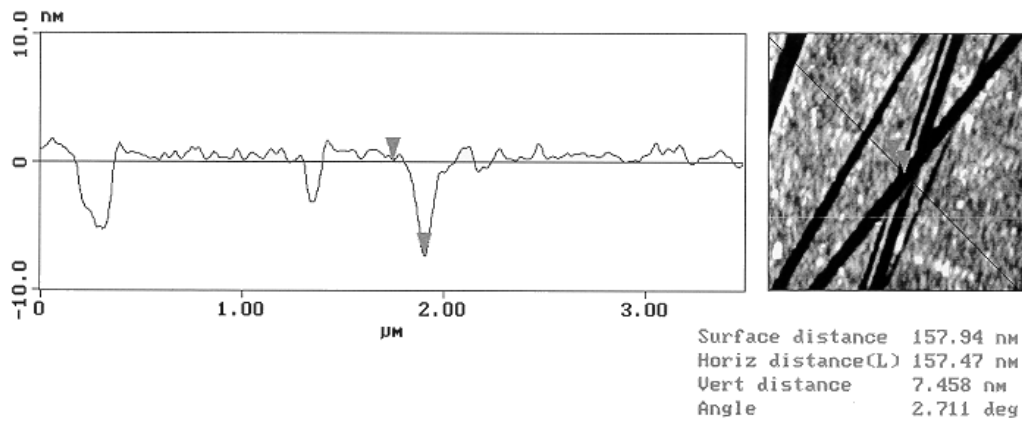


Abb. 3.9. : Sektionsanalyse der Ta_2O_5 –Oberfläche. Das AFM erlaubt eine Tiefenmessung der Rillenstruktur.

Die Einkerbungen hatten eine Vertiefung von 2-8 nm und eine Weite von 40-200 nm. Tabelle 3.3. faßt die Daten der Messungen zusammen und vergleicht sie mit anderen Materialoberflächen.

Material	Rauhigkeit RMS (nm)
Mica * „Glimmer“	0.027 – 0.042
Glas*	0.17 - 4.3
Ta_2O_5 , roh	0.463 ± 0.06 (8 Messungen)
APTS-modifiziertes Ta_2O_5	0.610 ± 0.05 (8 Messungen)
Schwingquartz (Gold Oberfläche), poliert*	0.64 –0.68
Schwingquartz (Gold Oberfläche)*	71 –122

Tab. 3.3. : Rauigkeitsvergleich verschiedener Oberflächen. (Die mit *-markierten Daten wurden von Dr. Luis O Kolarik, CSIRO, Melbourne, Australien ermittelt).

Die Oberfläche des Lichtwellenleiters stellte sich verglichen mit gesputterten Goldoberflächen als sehr glatt heraus, wobei lediglich die Schichtkristallstruktur des anorganischen Trägermaterials Mica eine signifikant geringere Rauigkeit besaß.

1.3.2. Visualisierung und Charakterisierung der Proteinbeschichtung auf der Sensoroberfläche

Zentrale Experimente der AFM-Untersuchungen sollten Aufschluß geben über die Belegung mit Rezeptorprotein auf der Biosensor-Oberfläche. Visualisiert werden sollten Proteinbeschichtungen bei der Verwendung von verschiedenen Immobilisierungsmethoden. Abbildung 3.10. zeigt jedoch, daß eine rein mikroskopische Betrachtung der Oberflächen keine Aussagen über den Grad der Proteinbedeckung zuließ.

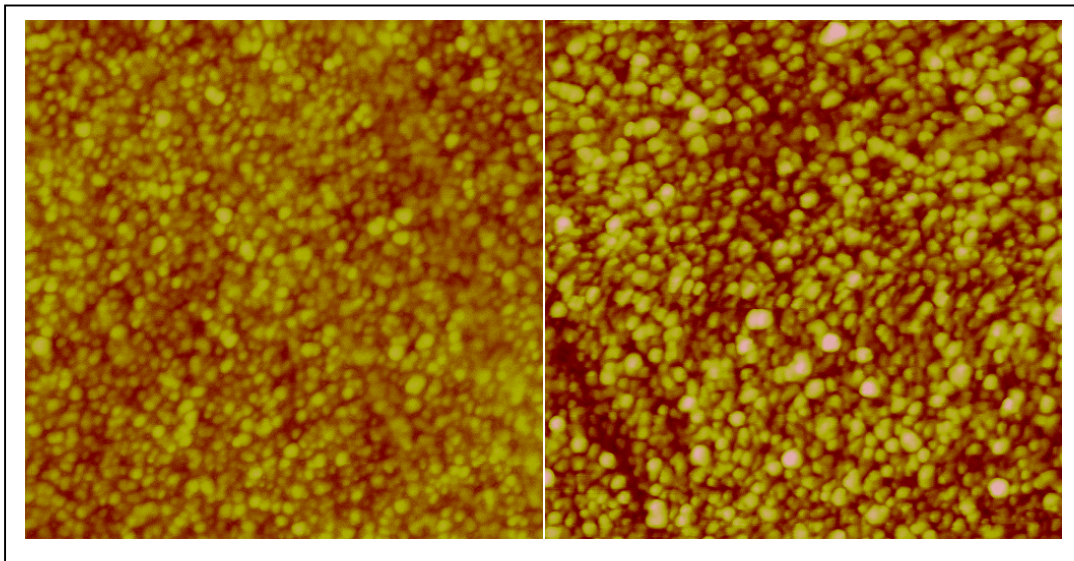


Abb. 3.10.: Links dargestellt ist der Scan einer rohen Ta_2O_5 -Oberfläche ($RMS = 0.46\text{ nm}$), während die rechte Darstellung ein Scan zeigt, der mit Avidin beschichtet und zuvor APTS-silanisiert und biotin-modifiziert wurde ($RMS = 0.97\text{ nm}$).

Deshalb wurde die Off-line Analytik der AFM-Software zur Charakterisierung herangezogen und versucht, Unterschiede in der Rauigkeit der einzelnen Proben in Bezug zu setzen.

Abbildung 3.11. faßt die Ergebnisse der Rauigkeits- und Höhenverteilung (Bearing depth) zusammen. Die Höhenverteilung bearing depth korreliert mit dem Verlauf der Rauigkeit. Die Standardabweichung lag für jeweils 8 Messungen bei 2.1 bis 12.8 % (Ausnahme 18,7 % für Probe 7).

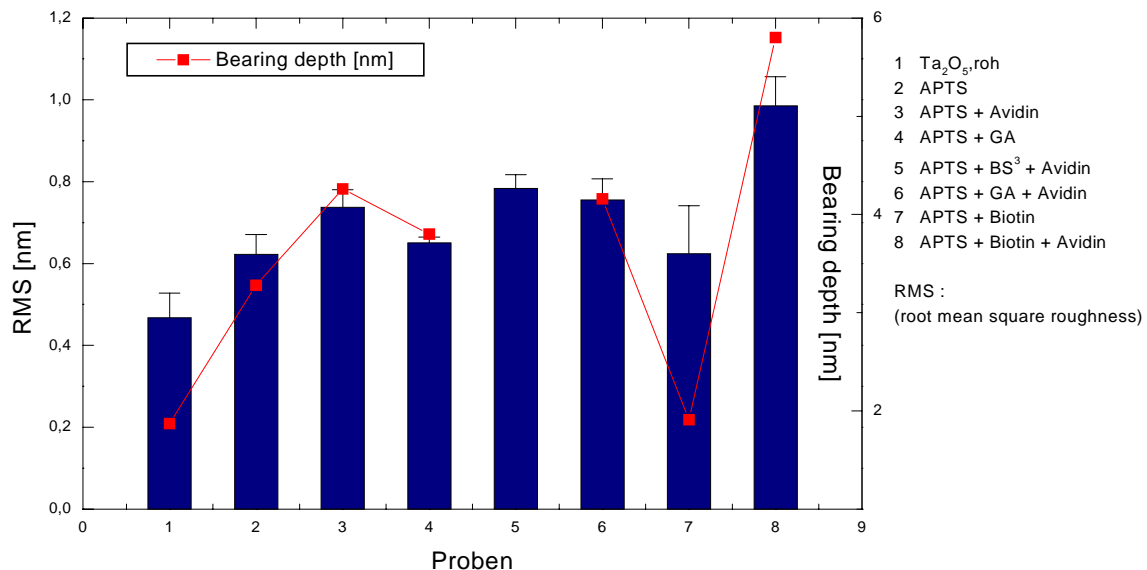


Abb. 3.11.: Zusammenfassung der Rauigkeit und Höhenverteilung von Lichtwellenleitern, deren Oberfläche unterschiedlich modifiziert wurden. Der Wert RMS (Root mean square) gibt die Rauigkeit in z-Richtung an, während Bearing depth eine Übersicht über die Abstände des höchsten gescannten Punktes und der Oberfläche angibt.

Der signifikante Anstieg der Rauigkeit von einer rohen (0,463 nm), bzw. von einer APTS-silanisierten (0,626 nm) zu einer Biotin-Avidin-modifizierten Oberfläche (0,986 nm) um 212 bzw. 158 % indiziert eine effektive Immobilisierung des Proteins über kovalent gebundenen Biotinmolekülen auf dem Träger.

Die Nutzung bifunktioneller Crosslinker wie Glutardialdehyd oder BS³ ergab dagegen eine der rein adsorptiven Proteinanlagerung ähnlichen Zunahme der Rauigkeit um 5 bis 25 % gegenüber dem APTS-silanisierten Chip.

Anzumerken bleibt, daß die ermittelten Daten nur Aussagen über die Zunahme der Rauigkeit durch die Proteinbeladung zuließen, nicht jedoch über Zunahme der Stabilität der Proteinbindung durch die Crosslinker. Ergänzende Experimente am Gitterkoppler ermöglichten einen Vergleich der Stabilität einer Biotin-vermittelten sowie einer adsorptiven

Bindung. Erstere zeigt aufgrund der hohen Affinität von Biotin zu Avidin eine hohe Anlagerungsdichte und Stabilität (s. Kap. III. 2.1.).

Obwohl die gemessene Rauigkeit der Oberfläche um über 200 % zunahm, war aufgrund der mittleren Größe der gesputterten Ta_2O_5 – Strukturen von 1.5 bis 2 nm keine Unterscheidung zwischen Avidin und Ta_2O_5 möglich, da die Proteine und das Oxid eine ähnliche Form und Größe besaßen.

Um die Proteinschicht dennoch sichtbar zu machen und deren Dicke abzuschätzen, wurde mit Hilfe der AFM-Spitze versucht, bei hohem Kraftaufwand im Kontaktmodus (Setpoint auf 6.0 V) die adsorbierten Proteine mechanisch zu verschieben. Abbildung 3.12. zeigt die Modifikation der Oberfläche durch zweimaliges Scannen über eine $1\text{ }\mu\text{m}^2$ große Fläche.

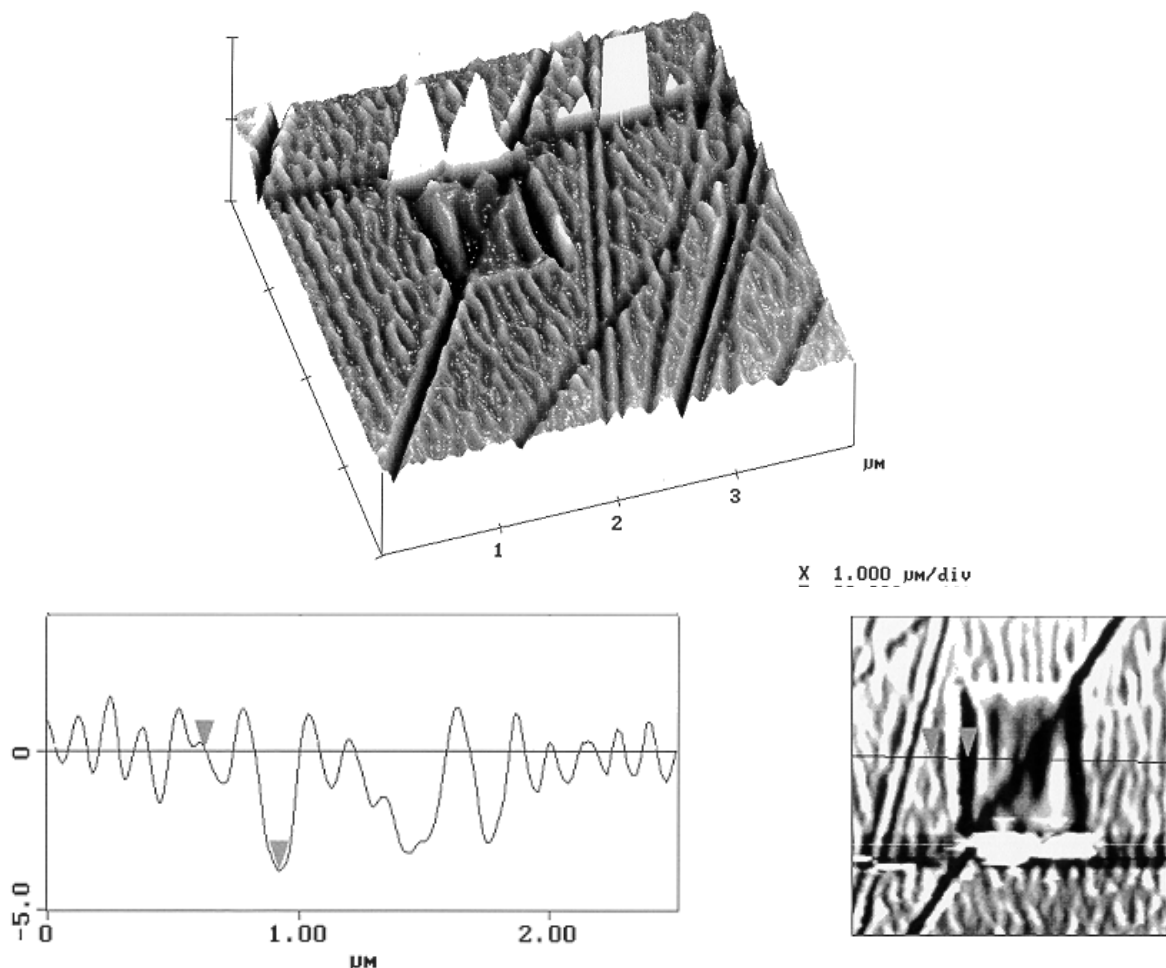


Abb. 3.12.: Die obere Darstellung zeigt einen 3D-Plot eines Areals, indem auf einer definierten $1\text{ }\mu\text{m}^2$ großen Fläche die Avidinbeschichtung durch zweimaliges Scannen im Kontaktmodus unter hoher Krafteinwirkung (Setpoint 6 V) verschoben wurde. In Abhängigkeit der Scanrichtung entstand eine Proteinanhäufung auf der oberen Seite. Die untere Darstellung zeigt die Höhenquerschnittsgraphik der Sektionsanalyse.

Der anschließend aufgenommene 3D-Plot einer $16\ \mu\text{m}^2$ -großen Übersichtsfläche zeigt, daß die Spitze die Proteine hauptsächlich in Scanrichtung (hier: von unten nach oben) verschoben hat. Da noch verbleibendes Protein sichtbar war, wurde die Scanzeit auf 15, 30 und 70 min ausgedehnt. Abbildung 3.13. zeigt eine zwei- bzw. dreidimensionale Darstellung desselben $5\ \mu\text{m}^2$ großen Gesamtscanbereichs.

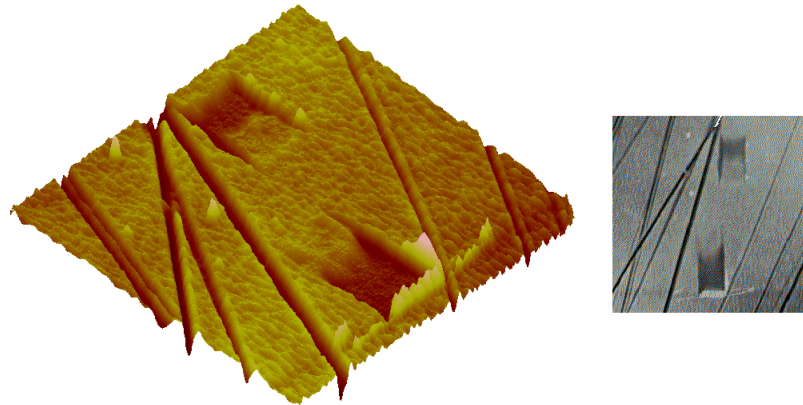


Abb. 3.13.: Links gezeigt ist ein dreidimensionaler Plot, der eine $5\ \mu\text{m}^2$ -Fläche abscannt. Die obere Vertiefung wurde durch 70 minütige, die untere durch 30 minütige Einwirkung des Kontaktmodus (Setpoint 6V) bewirkt. Rechts gezeigt ist ein zweidimensionaler Plot des selben Bereichs.

Tablle 3.4. faßt die erhaltenen Resultate für verschiedene Scanzeiten zusammen. Die Schichtdicke der Proteinlayer war scanrichtungsbedingt an verschiedenen Punkten unterschiedlich, so daß zur Mittelwertsberechnung eines Punktes jeweils 4 Werte herangezogen wurden.

Scanzeiten [min]	Links Ø [nm]	rechts Ø [nm]	Oben Ø [nm]	Unten Ø [nm]
1x in jede Richtung	3.2	2.9	nicht bestimmt	Nicht bestimmt.
15	3.3	n.d.	1.4	3.1
30	2.5	3.2	1.0	2.5
70	3.0	2.9	2.0	0.6

Tab. 3.4.: Verschiebung von adsorptiv gebundenen Avidin auf einer Ta_2O_5 – APTS modifizierten Oberfläche. Die Scanzeiten geben die Dauer der hohen Krafteinwirkung im Kontaktmodus an. Die angegebenen Richtungen beschreiben die Meßpunkte innerhalb des $1\ \mu\text{m}^2$ großen, freigeschobenen Bereiches.

Die ermittelte mittlere Schichtdicke von Avidin auf APTS-silanisierten Ta_2O_5 -Oberflächen betrug damit 2.8 bis 3.0 nm. Für nicht silanisierte Oberflächen wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Da eine Monolage des Proteins auf der glatten Oberfläche Mica auf ca. 1.7 nm bestimmt wurde (s. Kap. III. 1.3.3.), ist bei den Lichtwellenleitern die Schichtdicke zwischen einem Mono- und Bilayer einzuordnen. Aufgrund der vergleichsweise rauhen Ta_2O_5 -Oberfläche war die Ausbildung einer exakt geordneten Monolage wie auf Mica nicht möglich.

Ergänzend bleibt anzumerken, daß auch bei Anlagerung des Avidins über Biotinmoleküle (welche über APTS und Biocytin-hydrazid an die Oberfläche gebunden wurden), ein analoges leichtes Verschieben der Proteinschicht zu beobachten war.

In einem abschließenden Experiment wurde getestet, wie sich APTS-silanisiertes Ta_2O_5 bei analoger Krafteinwirkung (Setpoint bei 6.0 V) verhält. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß es sich bei der verschobenen Oberfläche lediglich um nicht-biologisches Material handelte. Abbildung 3.14. verdeutlicht die Krafteinwirkung im Kontaktmodus über 70 min. Dabei wurde die Oberfläche sichtbar angekratzt, jedoch war der meßbare Höhenunterschied nicht relevant, was bestätigte, daß es sich bei der verschobene Masse um Protein handelte.

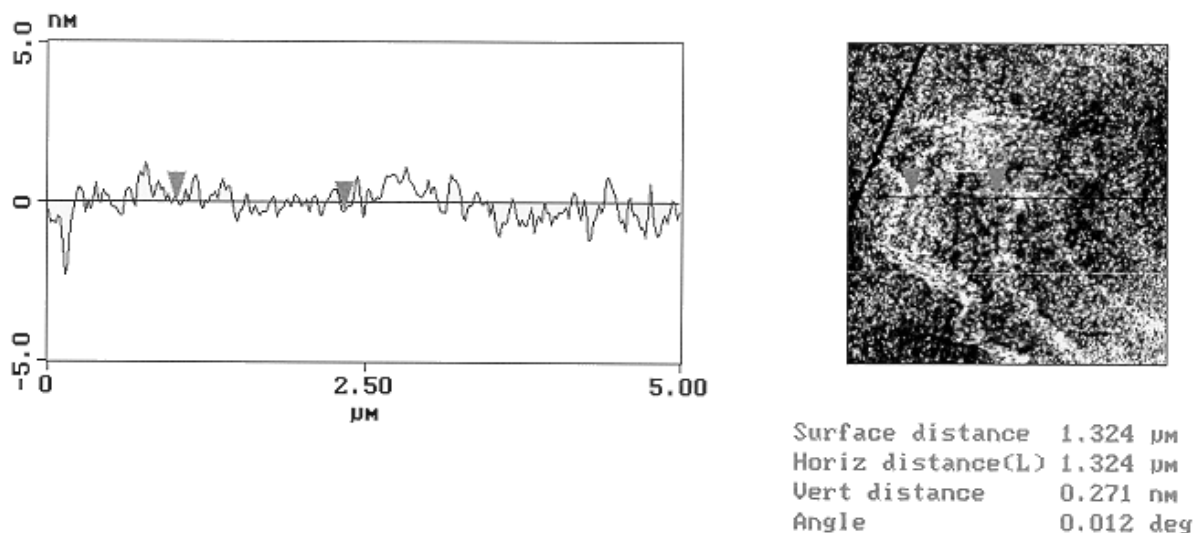


Abb. 3.14.: APTS-modifizierter Ta_2O_5 -Lichtwellenleiter ohne Proteinbeschichtung, auf den die AFM-Spitze im Kontaktmodus für 70 min eingewirkt hat.

1.3.3. Bestimmung der räumlichen Ausdehnung von Avidin mittels AFM

Die vertikale Ausdehnung eines Avidinmoleküls wurde auf der glatten Oberfläche anorganischen Micas auf 1.6 bis 1.7 nm bestimmt (Abb. 3.15.). Für diese Messung ist eine geringe Konzentration an Avidin (1 $\mu\text{g/ml}$) benutzt worden, um vereinzelte Moleküle zu erhalten.

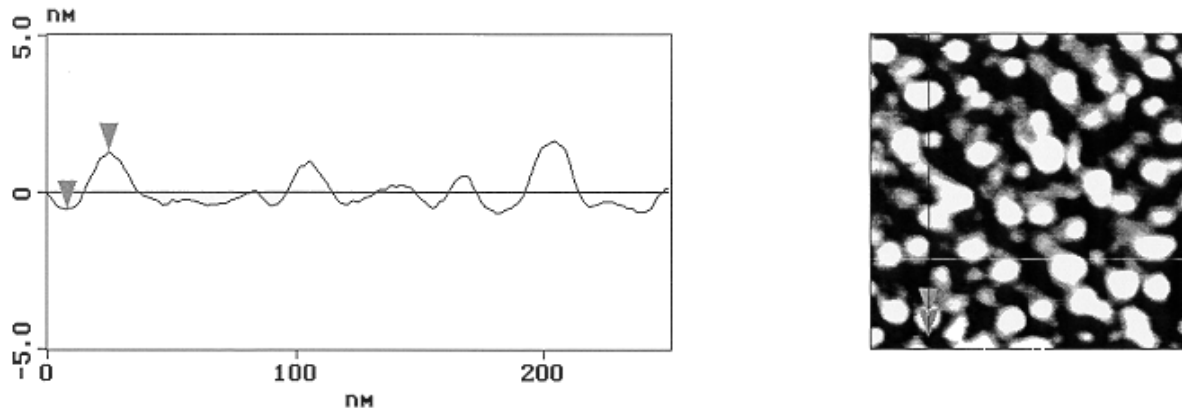


Abb. 3.15. : Höhenanalyse von Avidinmolekülen (1 $\mu\text{g/ml}$) auf Mica als Trägermaterial.

Bei einem weiteren Experiment zur Charakterisierung der Proteinausdehnung und der Beladungsdichte bei hohen Proteinkonzentrationen wurde auf einem räumlich begrenzten Teilstück von $0.85 \mu\text{m}^2$ Größe für 2 min bei hoher Krafteinwirkung (Setpoint: 4V) im Kontaktmodus gearbeitet. Ziel dieses Versuches war es, daß adsorptiv gebundene Protein zu verschieben, um die darunterliegende Micaoberfläche sichtbar zu machen. Damit sollte evaluiert werden, wie dick die abgelagerte Schicht war.

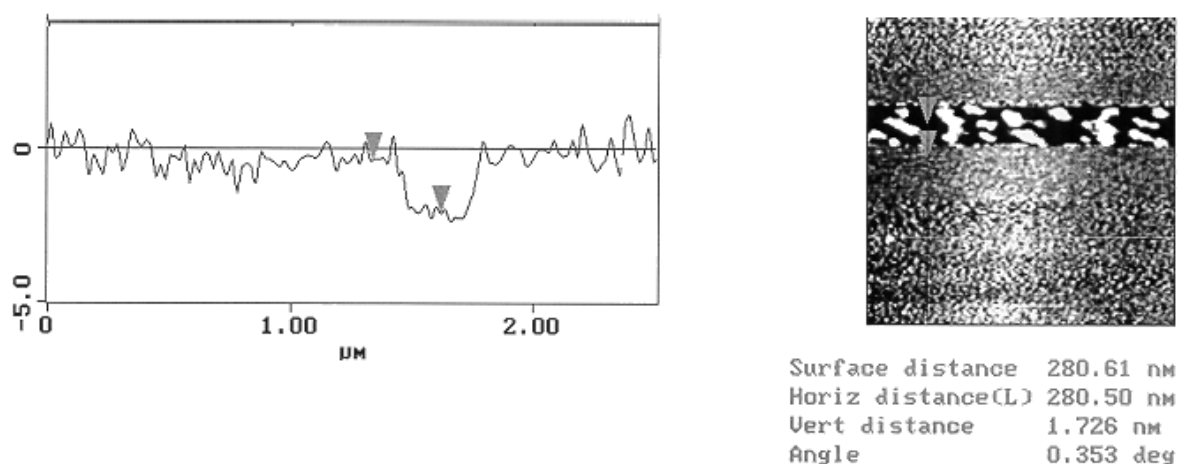


Abb. 3.16. : Höhenanalyse von Avidin (100 $\mu\text{g/ml}$) auf Mica. 2 min Shift von auf 13.6 % der gesamten Scanfläche bei hoher Krafteinwirkung (Setpoint : 4V).

Abb. 3.16 zeigt, daß die Höhe der Proteinschicht bei ca. 1.7 nm lag, was einer Monolage von Avidin entspricht. Deutlich wurde, daß selbst eine hohe Konzentration an Protein auf Mica keine nachweisbaren Multilayerstrukturen erzeugt.

Im Vergleich zur Oxidoberfläche des Lichtwellenleiters war die glatte Unterlage des Micas leicht von der Proteinbeschichtung zu diskriminieren. So konnte leichter sichergestellt werden, daß durch kürzere Applikationszeit und niedrigerem Kraftaufwand (4V statt 6V) die Oberfläche des Trägers bereits erreicht wurde.

1.3.4. Schlußfolgerungen :

- Das AFM ermöglicht dreidimensionale Beobachtung und Charakterisierung von Biosensor-Transduceroberflächen in Hinblick auf Rauigkeit und Höhenverteilung.
- Durch Mikromanipulation auf der proteinbeschichteten Oberfläche war es möglich, die Dicke der Avidinschicht zu bestimmen. Dazu wurde der Kontaktmodus verwendet, wobei die Krafteinwirkung manuell eingestellt werden konnte. Damit konnten adsorptives wie auch über Biotin-Moleküle immobilisiertes Avidin leicht verschoben werden.
- Ein einzelnes Protein auf einer glatten Mica-Oberfläche ergab eine durchschnittliche Höhe von 1.6-1.7 nm. Dagegen wurde die Schichtdicke auf der Biosensoroberfläche auf 2.8-3.0 nm bestimmt, die damit zwischen Mono- und Bilayer einzuordnen war.

2. Messungen am Gitterkoppler

2.1. Immobilisierung von Avidin bzw. Streptavidin auf Ta₂O₅-Lichtwellenleiter

Die Bindungsvermittlung von kurzen Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter erfolgte hauptsächlich durch das Protein Avidin bzw. Streptavidin, das mit hoher Affinität biotinylierte Rezeptormoleküle bindet.

Ziel war es, die Dichte an Avidin und damit an biotinylierter Nukleinsäure so hoch zu wählen, daß die Effektivität der Affinitätsreaktion maximiert wird. Daher wurde eine hohe Proteinkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt (Polzius *et al.*, 1996), um eine möglichst vollständige Absättigung der Oberfläche zu erreichen. Avidin wurde an nicht-modifizierten und APTS-silanisierten Ta₂O₅-Oberflächen adsorptiv gebunden. Eine spezifische Immobilisierung des Proteins an biotinylierten Oberflächen wurde vergleichend eingesetzt. Die folgende Abbildung 3.17. zeigt beispielhaft die Änderung des effektiven Brechungsindex ΔN_{eff} bei Verwendung von unterschiedlich vorbehandelten Chips. Dabei wurden jeweils analoge Proteinkonzentrationen eingesetzt :

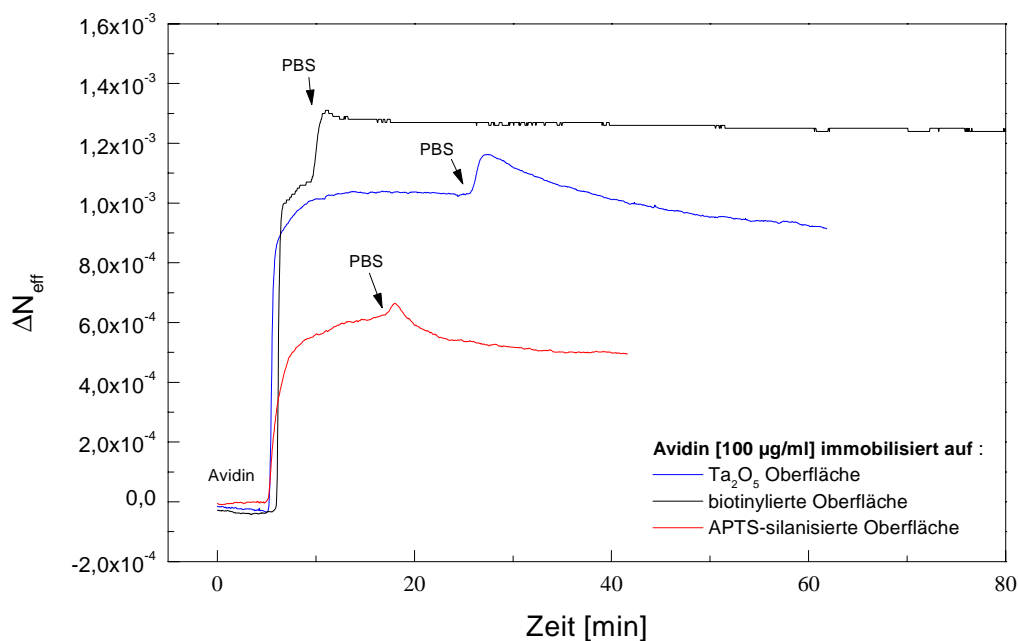


Abb. 3.17.: Immobilisierung von Avidin (100 µg/ml PBS, pH 7.6) an verschieden modifizierten Oberflächen. ΔN_{eff} korreliert mit der Menge an angelagertem Protein.

Vorteilhaft bei der Verwendung biotinylierter Oberflächen war die stabile Grundlinie nach der Immobilisierung des Proteins. Während bei der rein adsorptiven Bindung von Avidin an den Träger eine dissoziationsbedingte Abnahme des Meßsignal bis zu einem Gleichgewichtswert

einsetzte, wurde dieser Vorgang bei der biotinylierten Oberfläche nicht bzw. nur in geringem Umfang beobachtet:

Eine Immobilisierung via Biotin-Gruppen auf dem Lichtwellenleiter hatte nach 10 min Pufferspülung eine Signalreduktion von nur $1.9 (\pm 0.7) \%$ zur Folge. Eine 60-minütige PBS-Spülung verminderte das Ausgangssignal um lediglich 4.4% .

Vergleichsweise hoch war dagegen die Dissoziation des Proteins von der Oberfläche, wenn eine rein adsorptive Anlagerung erfolgte: So nahm das Signal nach 10 min Spülung mit Pufferlösung bei nicht modifizierter Ta_2O_5 -Oberfläche um durchschnittlich $10.2 (\pm 1.9) \%$, nach 60 min um $22.4 (\pm 2.3) \%$ ab. Eine adsorptive Anlagerung an APTS bewirkte eine noch höhere Dissoziation des Proteins. Nach 10 min waren $15.0 (\pm 5.3) \%$ nach 60 min bereits $24.6 (\pm 1.3) \%$ abgespült.

Aufgrund der Dissoziation des Proteins von der Oberfläche wurde daher vor jeder Messung 15 bis 60 min mit Pufferlösung gespült, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht war. Erst dann wurde das biotinylierte Rezeptormolekül angelagert. Durch dessen Bindung wurde die Grundlinie dann zusätzlich stabilisiert.

Wie Tabelle 3.5. zeigt, konnte mit einer biotinylierten Oberfläche neben der höchsten Stabilität auch der höchste Meßwert erzielt werden, der mit der Menge des gebundenen Proteins korreliert. Aufgezeigt ist der Unterschied im effektiven Brechungsindex vor und nach der Anlagerung des Proteins.

Modifikation des Sensors	ΔN_{eff}
Ta_2O_5 unbehandelt	$0.99 \cdot 10^{-3} \pm 2.9 \cdot 10^{-4}$
Ta_2O_5 APTS-silanisiert	$0.87 \cdot 10^{-3} \pm 3.7 \cdot 10^{-4}$
Ta_2O_5 biotinyliert	$1.3 \cdot 10^{-3} \pm 3.2 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 3.5.: Anlagerung von Avidin ($100 \mu\text{g/ml}$) an Ta_2O_5 -Lichtwellenleiter.

Die adsorptive Anlagerung an unbehandelte bzw. APTS-silanisierte Chips betrug lediglich 66 bzw. 76 % der spezifischen Anlagerung an biotinylierte Oberflächen. Zu beachten war jedoch, daß die Meßwerte Chip-abhängig gering reproduzierbar waren. So wurden bei gleichen verwendeten Konzentrationen an Protein und Immobilisierungsbedingungen Abweichungen von 25 bis 40% gefunden.

2.1.1. Schlußfolgerungen:

- Alle drei Sensoroberflächen (reines Ta₂O₅, silanisiert und biotinyliert) ermöglichten eine Anlagerung des Rezeptorproteins. Es gab jedoch Unterschiede in der Stabilität der Bindung und in der Assoziations- und Dissoziationskinetik. Biotinylierte Oberflächen lieferten eine Sensoroberfläche, die nach erfolgter, schneller Anlagerung des Proteins kaum Dissoziation desselben zeigten; im Gegensatz zu den anderen Methoden.
- Die adsorptive Immobilisierung auf unbehandeltem Ta₂O₅ war die einfachste und praktischste Methode, da aufwendige Modifikationen wie Silanisierung und Biotinylierung entfielen.

2.2. Bindung von biotinylierten Sonden

Ziel der Untersuchungen war es, die Dichte an biotinylierten Oligonukleotiden zu optimieren, d.h. eine möglichst hohe Dichte an Sonden zu gewinnen. Um einen Vergleich der Bindungseffektivitäten der Oberflächen für biotinylierte Sonden zu erhalten, wurden jeweils die Änderungen der Brechungsindices für die Avidinanlagerung und biotinylierte 24-mer Oligonukleotide ins Verhältnis gesetzt (s. Tabelle 3.6.).

Modifikation des Sensors	$\frac{\Delta N_{\text{eff}}(\text{biotinyliertes Oligo}) \cdot 100}{\Delta N_{\text{eff}}(\text{Avidin})}$
Avidin adsorptiv an Ta ₂ O ₅ unbehandelt	15.8 % ± 0.76 (6 Messungen)
Avidin adsorptiv an Ta ₂ O ₅ APTS-silanisiert	14.4 % (1 Messung)
Avidin spezifisch gebunden an Ta ₂ O ₅ biotinyliert	13.9 % ± 4.3 (10 Messungen)

Tabelle 3.6.: Anlagerung von biotinyliertem Oligonukleotid (2.5 µg) an Avidin (100 µg/ml) gebunden an verschieden modifizierte Ta₂O₅-Lichtwellenleiter. Die prozentuale Angabe setzt die Änderungen der Brechungsindices für die Anlagerung der biotinylierten Probe in Verhältnis zur Anlagerung des Avidins.

Berücksichtigt man die Molmassen der gebundenen Moleküle und den Umstand, daß der Brechungsindex von gelöster DNA und gelöstem Protein $dn/dc = 0.18 \text{ ml/g}$ (Bier, 1997) annähernd identisch ist, kann man aus den Daten für die Änderung des effektiven Brechungsindex das Verhältnis von Avidin zu biotinylierter Komponente berechnen (siehe auch Kap. II. 2.1.3., Gleichung (6), Tab. 3.7.). Alle Angaben beziehen sich jeweils auf einen abgesättigten Zustand, in dem alle zugänglichen Avidin-Bindungstaschen besetzt waren.

Trotz hoher Konzentration an biotinylierten Oligonukleotiden kommt es dann zu keiner signifikanten Steigerung ($\Delta N_{\text{eff}} < 3 \cdot 10^{-6}$) des Brechungsindex:

Modifikation der Oberfläche	Verhältnis Avidin : biotinyliertes Oligo
Ta ₂ O ₅ , unbehandelt	1 : 1.44 (± 0.2)
Ta ₂ O ₅ , APTS-silanisiert	1 : 1.3
Ta ₂ O ₅ , biotinyliert	1 : 1.2 (± 0.4)

Tab. 3.7.: Bindungsverhältnis von Avidin zur biotinylierten Probe in Abhängigkeit der Oberflächenmodifikation.

Um zu evaluieren, welche Menge biotinyliertes Oligonukleotid für eine Absättigung der Avidin-bedeckten Oberfläche notwendig ist, wurde eine steigende Konzentration an Oligonukleotid eingesetzt. Dabei wurde die Avidin-beschichtete Oberfläche mit jeweils steigenden Konzentrationen an biotinylierter Probe überströmt. Abbildung 3.18. zeigt die additive Zunahme des Sensorsignals durch Zugabe steigender Konzentrationen von biotinyliertem Oligonukleotid:

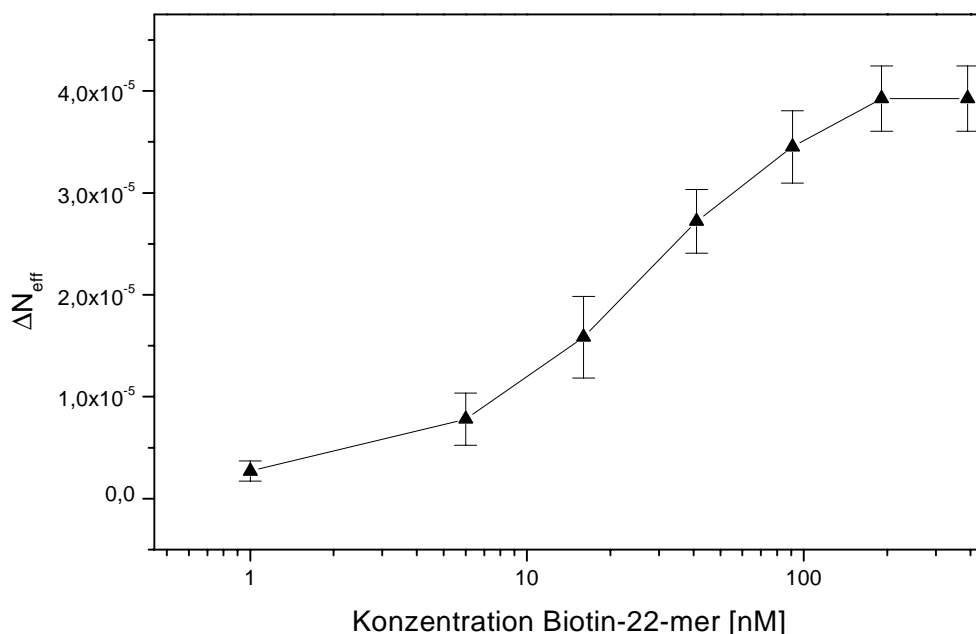


Abb. 3.18.: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von biotinylierten Oligonukleotiden (BiotinRNA4) an die Avidinmatrix ($\Delta N_{\text{eff}} = 5 \cdot 10^{-4}$). Laufpuffer : PBS, 0.4 M NaCl, pH 7.2. Als Chip diente ein unbehandelter Ta₂O₅-Lichtwellenleiter. Ein Kurvenverlauf entstand durch sequenziellen Überströmen mit steigenden Konzentrationen an BiotinRNA4.

Bei Erreichen der maximalen Bindungskapazität des Proteins für seinen Liganden fiel die Änderung des effektiven Brechungsindex trotz höherer Konzentration an Oligonukleotid geringer aus. Bei abschließender Zugabe einer 200 nM-Lösung (insgesamt 200 µl Volumen) veränderte sich der Brechungsindex nicht mehr, so daß von einer abgesättigten Oberfläche auszugehen war.

Berechnet man das Bindungsverhältnis von Avidin zu biotinyliertem Oligo in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration, ergibt sich der in Abbildung 3.19. dargestellte Zusammenhang:

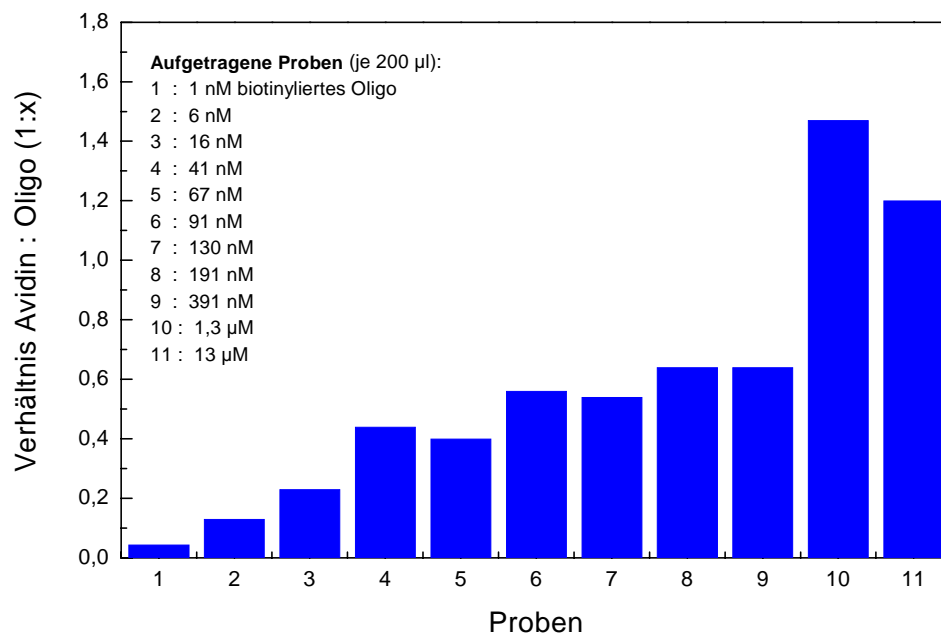


Abb. 3.19.: Bindungsverhältnis von Avidin zur biotinylierten Probe. Bezogen sind die Werte auf x biotinylierte Oligonukleotide pro Molekül Avidin ($1 : x$). Die Avidinkonzentration wurde jeweils konstant hoch gewählt (100 µg/ml). Als Oberfläche diente jeweils unbehandeltes Ta_2O_5 .

Wiederholt wurde durch die Untersuchung deutlich, daß bei der Verwendung von biotinylierten 22-mer Oligonukleotiden (BiotinRNA4) lediglich maximal 1.5 Moleküle pro Avidin gebunden werden konnten. Dieses Ergebnis kann mit der Bindungskapazität des Proteins, gebunden über eine dreidimensionale Dextranmatrix verglichen werden (s. Kap. III. 3.1.).

2.3. Hybridisierungsreaktionen und Regenerierungen am Gitterkoppler

Nach der Vorbereitung des Sensors für die eigentliche Hybridisierungsreaktion wurde bestimmt, welche Längen und Konzentrationen der zu hybridisierenden Proben notwendig waren, um ein signifikantes Signal zu erzeugen.

Einführend zeigt die Abbildung 3.20. einen beispielhaften Verlauf einer Hybridisierung, die on-line am Gitterkoppler verfolgt wurde. Die Streptavidin-Oberfläche war dabei, wie in der linken Graphik skizziert, mit einer biotinylierten 25-mer Sonde vorbeschichtet.

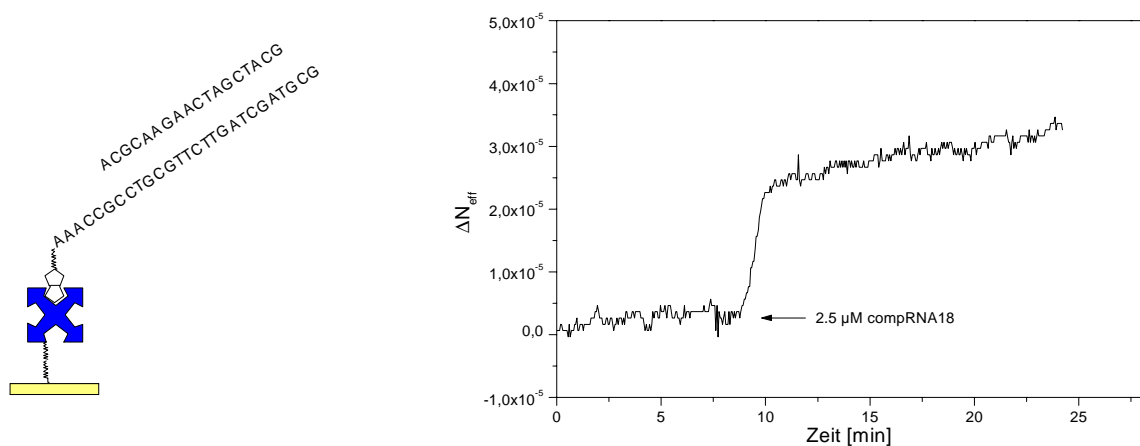


Abb. 3.20.: Die linke Darstellung zeigt schematisch die Hybridisierungsreaktion zwischen der via Avidin gebundenen Sonde (25-mer: BiotinRNA5, $\Delta N_{\text{eff}} = 4,4 \cdot 10^{-4}$) und einem 18-mer (compRNA3, 2,5 μM , Volumen: 200 μl). Die rechte Darstellung repräsentiert die Änderung des effektiven Brechungsindex verursacht durch die Massezunahme.

2.4. Einfluß der Länge des Probenoligonukleotids

Der direkte labelfreie Nachweis von Molekülen mit Hilfe des Gitterkopplers gelang bisher mit Substanzen, die ein Molekulargewicht von $> 2000 \text{ g/mol}$ besaßen (Polzius *et al.*, 1997). Es sollte hier nachgewiesen werden, welche DNA-Basenpaarlänge die untere Nachweisgrenze des Sensors markiert.

Bei den Messungen wurden sowohl biotinylierte als auch unbehandelte Lichtwellenleiter verwendet, so daß die Beladungsdichte der biotinylierten Sonde allein aufgrund unterschiedlicher Avidinkonzentrationen auf dem Sensor variierte. Daneben verdeutlichte Tabelle 3.5. (Kap. III. 2.1.) bereits, daß auch die Unterschiede der Proteinbeladung bei Chips *gleicher Vorbehandlung* signifikant waren, so daß die Meßwerte für die Bindung des biotinylierten Molekül jeweils gemittelt wurden. Sechs Datensätze ergaben einen

Durchschnittswert von $\Delta N_{\text{eff}} = 1.4 \cdot 10^{-4}$ (unbehandelte Oberfläche) mit einer Standardabweichung von $\pm 0.46 \cdot 10^{-4}$ bzw. $\Delta N_{\text{eff}} = 1.43 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0.31 \cdot 10^{-4}$) (biotinylierte Oberfläche).

Um verschiedene Chips miteinander vergleichen zu können, wurden alle für die Hybridisierung gemessenen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den durchschnittlichen ΔN_{eff} -Wert normiert. Grundlage dieser Normierung ist die Annahme, daß das *Hybridisierungsverhältnis* zwischen Sonde und Probe aufgrund des Massenwirkungsgesetzes für das entsprechende Experiment gleich blieb (s. Kap. II. 2.1.3., Gleichung (7)).

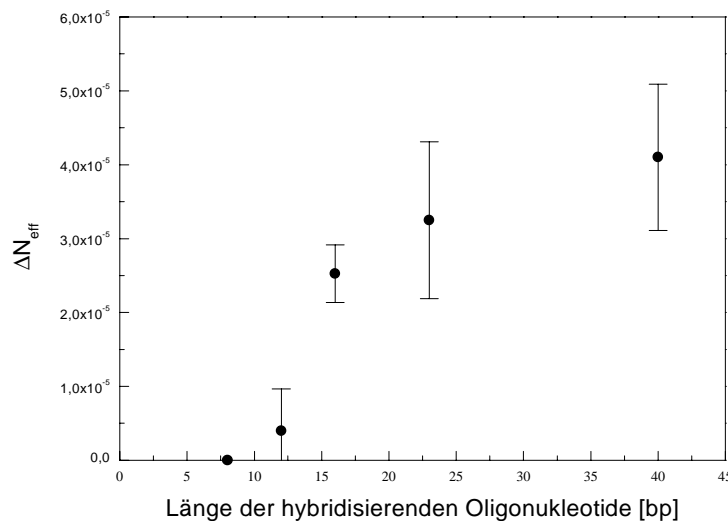


Abb. 3.21 : Sensorsignal in Abhängigkeit der Länge des hybridisierten Proben-Oligonukleotids (je 10 µg in 200 µl PBS injiziert, 1 M NaCl, pH 7.6). Oberflächengebundene Sonde war ein biotinyliertes 24-mer (Biotin-24-mer, $\Delta N_{\text{eff}} = 1.4 \cdot 10^{-4}$). Die Sequenzen der hybridisierten Proben sind in Kap. II. 1.3 dargestellt.

Die Ergebnisse über die Längenabhängigkeit zeigten, daß ein kurzer Strang von 8 Basenpaaren (2400 g/mol), der komplementär zu der Sonde auf der Oberfläche ist, kein Sensorsignal erzeugte. Eine Länge von 12 Basenpaaren (3659 g/mol) dagegen reicht gerade aus, um ein nachweisbares signifikantes Signal zu bewirken.

Berechnete man das *Hybridisierungsverhältnis* nach Gleichung (7), also den prozentualen Anteil der Duplexe auf der Sensoroberfläche an der Gesamt-Sondenkonzentration, so erhielt man für die verschiedenen Längen die folgenden Ergebnisse :

Länge an Probenoligo	Hybridisierungsverhältnis (Ø)
12-mer	64 % (0.4 M NaCl)
16-mer	44 %
22-mer	32 %
28-mer	14 %
40-mer	18.5 %

Tab. 3.8.: Durchschnittliches Hybridisierungsverhältnis von Probenoligonukleotiden unterschiedlicher Länge an biotinylierter Sonde (Biotin 24-mer). Als Puffer diente PBS (1 M NaCl, pH 7.6) mit einer Hybridisierungsdauer von 30 min. Die Meßtemperatur lag bei 25°C. (Eine Ausnahme bildete die 12-mer Probe mit einer Hybridisierungszeit von 10 min und einer Na⁺-Salzkonzentration von nur 0.4 M.)

2.5. Einfluß der Konzentration der Probe auf das Sensorsignal

Zwei unterschiedliche Längen wurden zur Charakterisierung der Konzentrationsabhängigkeit des Sensorsignals angewendet : ein 12-mer sowie ein 18-mer (compRNA3). Das 12-mer lag aufgrund seiner geringen Länge an der unteren Nachweisgrenze des Gitterkopplers (s. Kap. III. 2.4.) und war deshalb eine interessante Probe. Das 18-mer compRNA3 wurde vergleichend eingesetzt.

Wichtig anzumerken ist, daß beide Proben auf unterschiedlichen Chips untersucht wurden, die variierende Avidinbeschichtungen besaßen. Die Konsequenz war, daß eine Absättigung mit biotinylierter Sonde BiotinRNA4 jeweils unterschiedliche Änderungen des effektiven Brechungsindex bewirkte, die folglich mit unterschiedlicher Beladung korrelierte. Der für die Hybridisierungsuntersuchungen des 12-mers verwendete Chip ergab ein ΔN_{eff} von $3.5 \cdot 10^{-5}$ für die Sonde, während der Chip für das 18-mer ein ΔN_{eff} von $4.4 \cdot 10^{-5}$ zeigte.

Die in Abbildung 3.22. gezeigte Relation deutet für das kürzere Oligonukleotid auf eine notwendige Konzentration > 500 nM, um ein Sensorresponse zu erhalten. Erwähnenswert an dieser Stelle ist wieder der Zusammenhang zwischen Beladung des Sensors mit Sonde und der Nachweisgrenze für die Probe: Für eine weit geringere Sonden-Menge auf der Oberfläche wäre ein zu höheren Probenkonzentrationen verschobener Nachweisbereich zu erwarten.

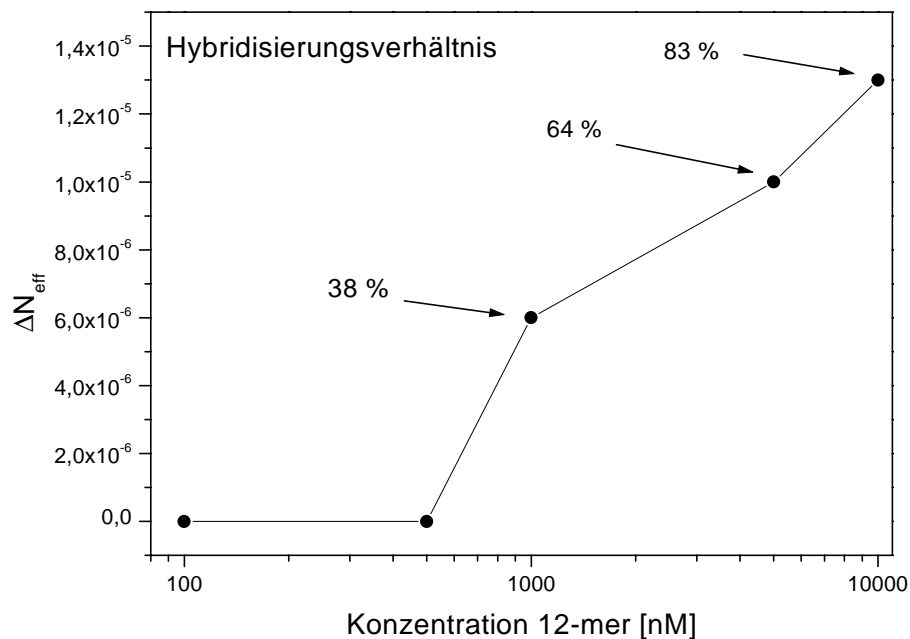


Abb. 3.22.: Abhängigkeit des Sensorsignals von der Konzentration der Probe (12-mer), die an eine 22-mer Sonde (BiotinRNA4, $\Delta N_{\text{eff}} = 3.5 \cdot 10^{-5}$) hybridisiert. Die prozentualen Werte geben an, wieviel Sondenmoleküle jeweils hybridisiert sind. Der Hybridisierungspuffer war jeweils PBS (pH 7.6, 0.4 M NaCl), das Injektionsvolumen betrug 200 μl Probe.

Lag im Fall des 12-mers die Hybridisierungsrate bei <6.5 %, so wäre das zu erwartende Signal im Bereich des Grundrauschens des Gitterkopplersystems und damit nicht auswertbar.

Bei hohen Konzentrationen läßt sich die Hybridisierungsrate des 12-mers bis auf 83 % steigern. Begünstigend dafür war die Schmelztemperatur, die mit 39°C (für 0.4 M NaCl) so hoch lag, daß die gebildete Duplex stabil war. Ein 8-mer hat nach Gleichung (1) bei gleichen Hybridisierungsbedingungen einen vergleichsweise niedrigen Schmelzpunkt von ca. 11 °C, so daß man hier bei einer Hybridisierungstemperatur von 25°C von einer sehr instabilen Duplex ausgehen konnte.

Das längere 18-mer zeigte bereits bei einer Konzentration von 250 nM ein gut auswertbares Signal (Abb. 3.23.) :

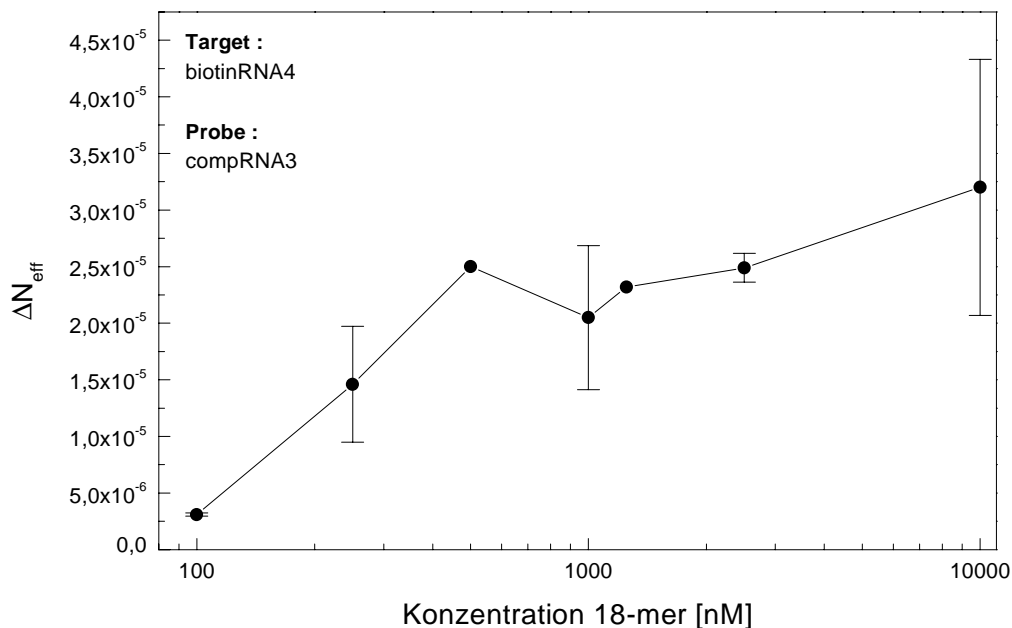


Abb. 3.23.: Abhängigkeit des Sensorsignals von der Konzentration einer 18-mer Probe (compRNA3), die an eine 22-mer Sonde (BiotinRNA4, $\Delta N_{\text{eff}} = 4.4 \cdot 10^{-5}$) hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer war jeweils PBS (pH 7.6, 0.4 M NaCl), das Injektionsvolumen betrug 200 μl Probe.

Da das längere Oligonukleotid in Vergleich zum 12-mer bei gleicher Hybridisierungsrate mehr Massezunahme auf der Sensoroberfläche bewirkt, war das Hybridisierungsereignis schon bei einer niedrigeren Konzentration nachweisbar.

Ein weiterer Grund für die geringere Nachweisgrenze bietet die um ca. 25 % höhere Änderung des effektiven Brechungsindex für die Beladung mit Sonden-Oligonukleotid bei der Hybridisierung mit 18-mer.

2.6. Regenerierungen am Gitterkoppler

Wesentliche Aspekte für die Messungen am Gitterkoppler waren Kalibrierbarkeit und Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche nach erfolgter Messung.

Generell sind zwei Methoden zur Auftrennung („Schmelzen“) des gebildeten DNA-Doppelstranges denkbar :

- Temperaturerhöhung, bis genügend Aktivierungsenergie vorhanden ist, die zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen ausreicht. Mit Gleichung (1) berechnet sich für ein Beispiel-Doppelstrang von 24 bp (12xG-C und 12xA-T) bei 1 M NaCl die

Schmelztemperatur auf ca. 74°C. Da aufgrund der hohen Temperaturempfindlichkeit des Meßsystems eine exakte Stabilität erreicht werden mußte, war die Temperatur-induzierte Denaturierung des Doppelstranges im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

- pH-Shift, der zum Aufbrechen der H-Brücken führt.

Letztere Methode, die durch Verwendung von NaOH in der Molekularbiologie häufig Einsatz findet (Maniatis *et al.*, 1988), bewirkte neben dem Aufschmelzen der Stränge auch einen Signalabfall der Grundlinie. Auch längeres Spülen (30 - 60 min) mit Puffer konnte das Grundlinienniveau vor dem pH-Shift nicht wieder erreichen.

Auch die Verwendung von Avidin, das über Biotinmoleküle auf der Oberfläche immobilisiert wurde, zeigte eine signifikante Verschiebung der Grundlinie.

2.7. Schlußfolgerungen:

- Die Bindung der Sonde ergab ein mittleres Verhältnis von Avidin zu biotinyliertem Oligo von 1:1.2-1.44.
- Die Hybridisierung von Sonden-Oligonukleotiden mit der Probe konnte mit dem Gitterkoppler on-line verfolgt werden. Dabei wurden *Hybridisierungsverhältnisse* von bis zu 83% für ein 12-mer gefunden.
- Längenabhängigkeit: Die untere Nachweisgrenze für kurze Oligonukleotide war bei den gewählten Bedingungen das 12-mer; die Hybridisierung eines 8-mers konnte nicht mehr effektiv nachgewiesen werden.
- Konzentrationsabhängigkeit: Für ein 12-mer war eine Konzentration > 500 nM, für ein 18-mer ab 250 nM notwendig, um ein ausreichend hohes Sensorsignal zu erreichen. (Die direkte Vergleichbarkeit war nicht gegeben, da die Oberflächen mit einer unterschiedlichen Menge an biotinylierter Sonde vorbeschichtet waren (s. Kap. III. 2.5.)).
- Regenerierungen: Eine Spülung mit 50 mM NaOH bewirkte neben der effektiven Denaturierung der Doppelstränge ein Absinken der Basislinie am Gitterkoppler. Auch nach längerem Spülen konnte das vormalige Grundlinienniveau nicht wieder erreicht werden. Eine erneute Hybridisierungsreaktion zeigte ein geringfügig niedrigeres Signal.

2.8. Nachweis von interkalierenden Verbindungen mit Hilfe des Gitterkopplers

Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob niedermolekulare DNA-Einlagerungsverbindungen ($< 2000 \text{ g/mol}$) am Gitterkoppler nachgewiesen können. Zwei Fragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen :

- Verändern niedermolekulare Substanzen durch Einlagerung in die Doppelhelixstruktur den effektiven Brechungsindex des System derart, daß sie trotz der geringen Größe nachweisbar sind ?
- Können Signale von Hybridisierungsereignissen durch die Einlagerung von niedermolekularen Substanzen amplifiziert werden ?

Immobilisierte man chromosomale DNA (aus Hering), die eine große Menge an potentiellen Bindungsstellen für den Interkalator besitzt, an APTS-silanisierten Oberflächen, erhielt man eine stabile Anlagerung des Polyanions. Die Aminofunktionen wechselwirken über Coulomb-Kräfte mit den Phosphatgruppen der Nukleinsäure und bewirken eine schnelle und reproduzierbare Adsorption der Moleküle. Die Zugabe von 25 bzw. 125 μM (10 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$) Ethidiumbromid zeigte nachfolgend eine Signalverschiebung von ca. $\Delta N_{\text{eff}} = 3 \cdot 10^{-5}$ und eine hohe Verweilzeit auf dem Sensor, wie aus Abbildung 3.24. deutlich wird :

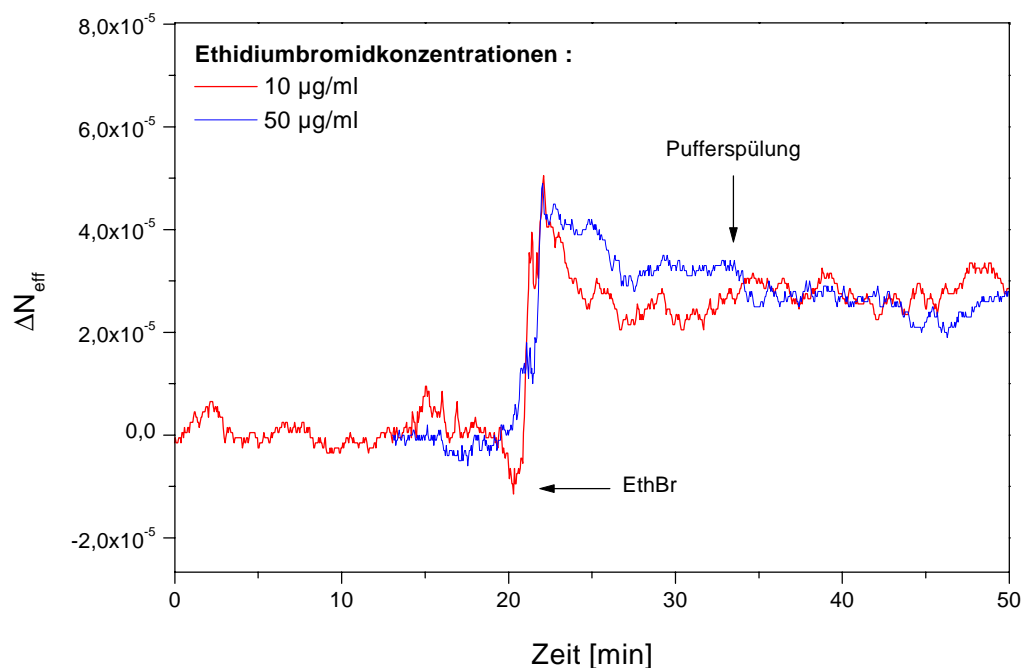


Abb. 3.24.: Signalverschiebung bedingt durch die Wechselwirkung von Ethidiumbromid mit chromosomaler Herings-DNA. Die rote Kurve zeigt das Signal bedingt durch 10, die blaue Kurve bedingt durch 50 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid.

Ethidiumbromid bindet neben doppelsträngiger DNA auch an einzelsträngige Nukleinsäuren, jedoch mit einer weit geringeren Affinität (Lottspeich *et al.*, 1998). Daher sollte die Bindung an kurzen Einzel- und Doppelsträngen gegenübergestellt werden. Abbildung 3.25. demonstriert die Änderung des effektiven Brechungsindex, bewirkt durch Bindung des Interkalators an ein biotinyliertes 24-mer und an einer Duplex gebildet aus dem 24-mer und einer 28 bp langen Probe :

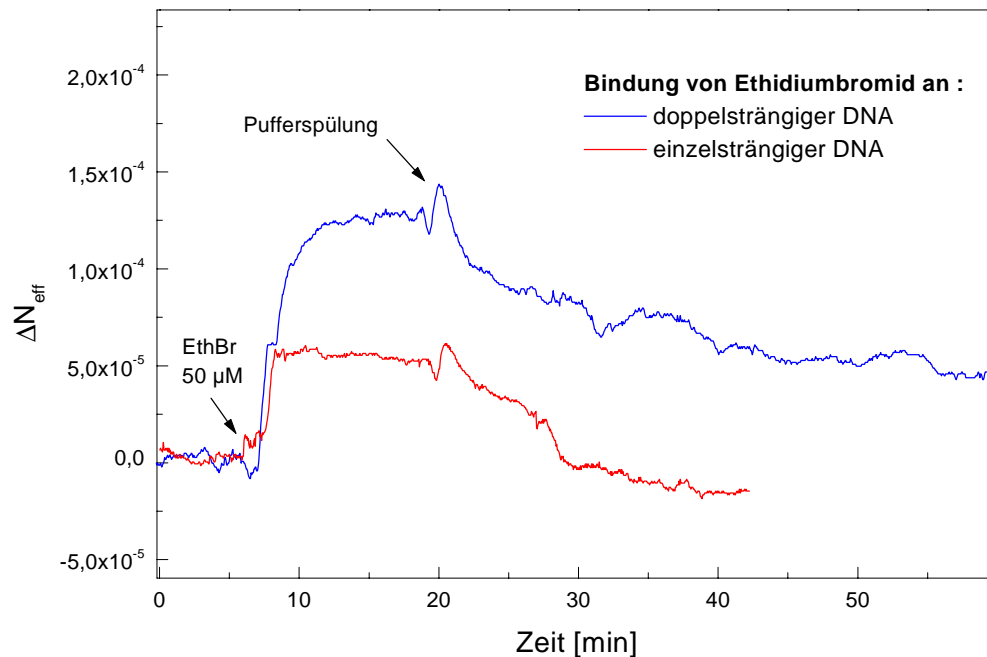


Abb. 3.25.: Bindung von Ethidiumbromid (EthBr) an doppelsträngiger DNA (Biotin24-mer (Sonde) hybridisiert mit komplementärem 28-mer (Probe), gebunden über Biotin an Avidinmatrix) und einzelsträngiger DNA (Biotin24-mer). Nach 11-minütiger Inkubation setzte PBS-Pufferspülung ein und wusch den Interkalator aus.

Die Änderung des effektiven Brechungsindex war bei der Anlagerung an einzelsträngigen Oligonukleotiden nicht nur um 60 % geringer, auch die Verweilzeit der Substanz auf dem Sensor war reduziert. So spülte der PBS-Puffer nach 4-5 min bereits die Hälfte aller gebundenen Moleküle von der Oberfläche, während das Signal bei Anlagerung an doppelsträngigen Helices erst nach ca. 20 min halbiert war.

Abschließend sollte der Grad an unspezifischer Wechselwirkung des Interkalators mit der Avidinmatrix demonstriert werden. Abbildung 3.26. zeigt die Signalverschiebung bedingt durch eine Konzentration von 50 μM Ethidiumbromid :

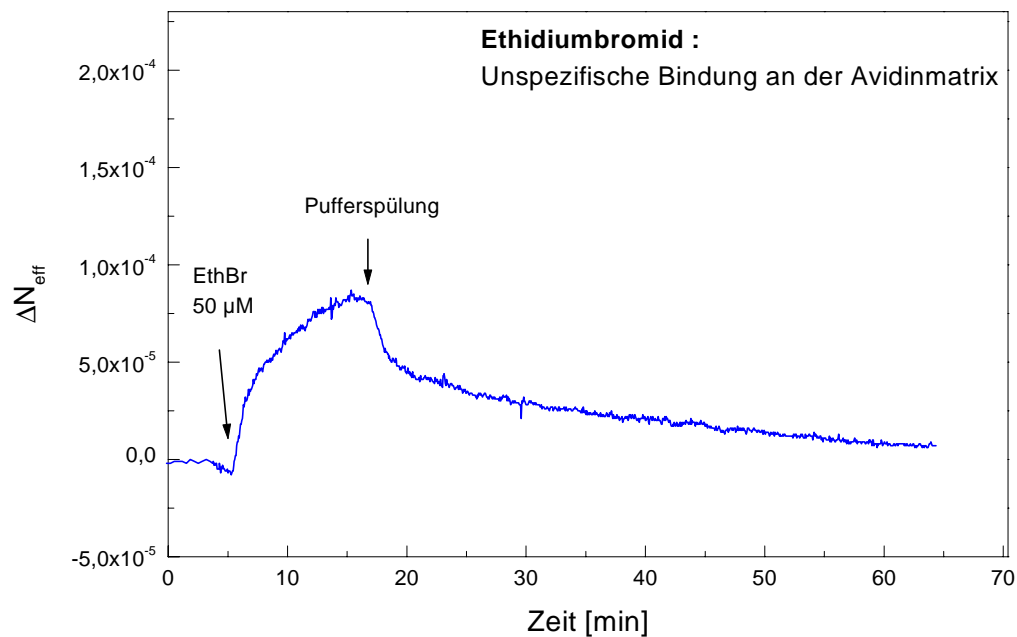


Abb. 3.26.: Unspezifische Bindung von Ethidiumbromid ($20 \mu\text{g/ml} = 50 \mu\text{M}$) an der Avidin-matrix der Sensoroberfläche.

Analog zur Untersuchung der Bindung von Ethidiumbromid an einzelsträngiger DNA lag die Halbwertszeit bei 4-5 min. Verglichen mit der doppelsträngigen DNA zeigte sich hier eine höhere Dissoziationsrate der Einlagerungsverbindung von der Avidinoberfläche.

Die Signalthöhe der Bindung des Interkalators an den Doppelstrang (s. Abb. 3.25.) betrug nach 40 min Spülen noch ca. 40 %, während bei unspezifischer Wechselwirkung des Interkalators mit der Avidinmatrix nach gleicher Spüldauer nur noch ca. 12 % verbliebenes Ethidiumbromid nachweisbar war.

Unter Berücksichtigung des molaren Gewichtes der verschiedenen Substanzen und der unspezifischen Bindung erhielt man nach Gleichung (6) für den Doppelstrang ein Verhältnis von 8.6 Molekülen Ethidiumbromid pro DNA (nach 10 min Spülen mit Puffer). Geht man davon aus, daß das Signal für den Interkalator ausschließlich durch Wechselwirkung mit der Helix erzeugt wurde, bedeutet das Resultat, daß sich statistisch zwischen jedes dritte Basenpaar ein Molekül Ethidiumbromid schiebt.

2.8.1. Schlußfolgerungen :

- Die Bindung interkalierender Substanzen wie Ethidiumbromid an doppelsträngiger DNA wurde am Gitterkoppler bis zu einer Konzentration von 20 µg/ml (ca. 50 µM) detektiert. Es wurde keine exakte Nachweisgrenze bestimmt, die jedoch aufgrund von nicht dargestellten Eingangsexperimenten niedriger liegen dürfte.
- Die niedermolekulare Substanz zeigte trotz der geringen Größe ein Sensorsignal.
- Die Dissoziationskinetik des Interkalators war verfolgbar.
- Ethidiumbromid erhöht das Signal für den Doppelstrang um ca. 22 %; die Toxizität der interkalierenden Verbindungen läßt einen Einsatz als „Signalverstärker“ am Gitterkoppler jedoch nicht sinnvoll erscheinen. Unspezifische Wechselwirkungen können zudem unklare Ergebnisse liefern.

2.9. Direktsynthese von Oligonukleotiden an Lichtwellenleitern

Eine andere Methode zur Immobilisierung von Sonden-Oligonukleotiden war die Direktsynthese über die *Phosphoramiditmethode* (s. Kap. II. 2.1.1.6.), die den Aufbau einer einfachen Sequenz aus 12- bzw. 18 Cytosinen erlaubte. Als Gegenstrang wurde ein 22-mer aus Guaninen (G22) eingesetzt, sowie das nicht-komplementäre Oligo Probe 22-mer (Sequenz s. Kap. II. 1.3.).

Abbildung 3.27. zeigt den Anlagerungsverlauf der beiden Oligonukleotide bei einem Test auf unspezifische Bindung an einer GOPS/Hexaethylenglykol-modifizierten Matrix (Precursorstruktur, *ohne* synthetisierten Cytosinstrang). Die allgemeine Versuchsbeschreibung zu den hier durchgeführten Experimenten ist in Kap. II. 2.1.1.4. zu finden :

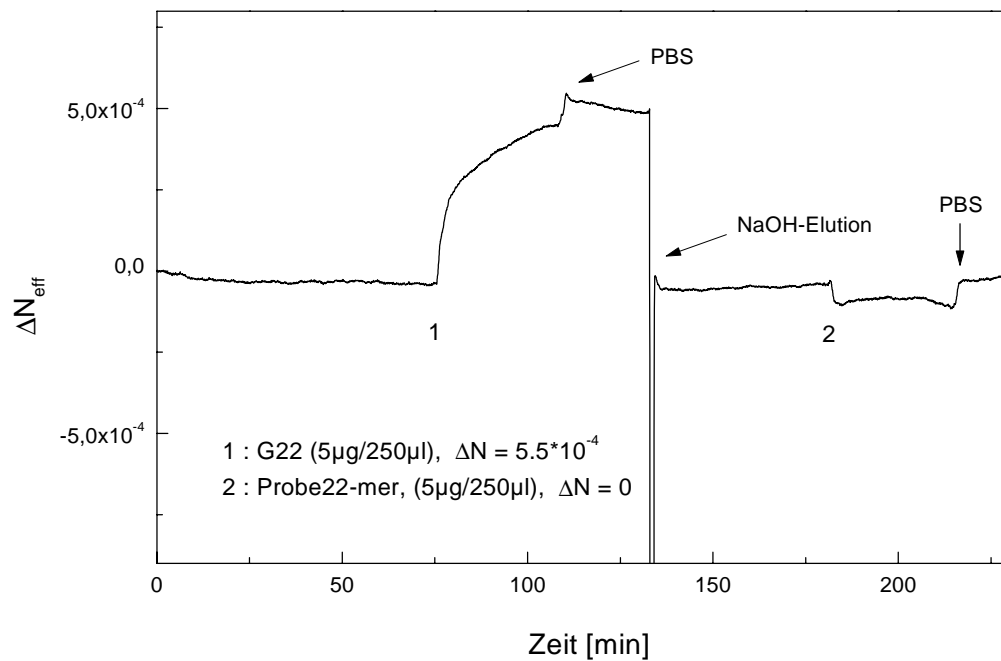


Abb. 3.27.: Unspezifische Bindung verschiedener Oligonukleotide an GOPS/ Hexaethylen-glykol modifizierter Ta_2O_5 -Lichtwellenleiteroberfläche. Der Laufpuffer enthielt jeweils 1 M NaCl sowie 0.1 % Tween 20.

Sehr deutlich zeigte sich die Anlagerung des 22-mers aus Guaninen (G22), wogegen überraschenderweise ein Oligonukleotid gleicher Länge (22-mer) aber unterschiedlicher Sequenz während der 30 minütigen Inkubationsphase keinerlei unspezifische Bindung an die Oberfläche aufwies. Auch die Zugabe des Detergenz Tween 20 (0.1 %ig) konnte die Bindung der Oligonukleotide nicht vermindern. Eine Erklärung bot die Salzabhängigkeit der unspezifischen Bindung von G22 (Abb. 3.28.):

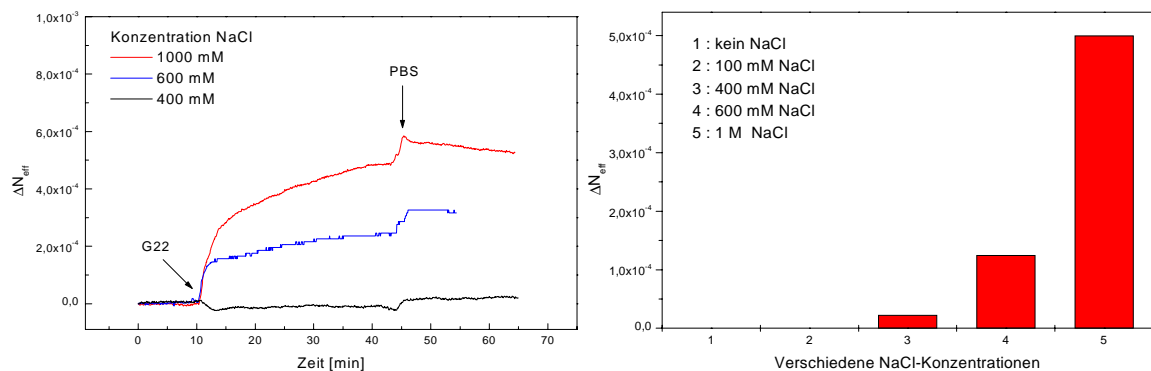


Abb. 3.28.: Salzabhängigkeit der Bindung von G22 (je 20 $\mu\text{g/ml}$) an GOPS/ Hexaethylenglykol modifizierter Ta_2O_5 -Lichtwellenleiteroberfläche. Die linke Graphik zeigt die Änderung des effektiven Brechungsindex am Gitterkoppler. Rechts dargestellt ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Ab 400 mM NaCl im Puffer war eine signifikant erhöhte Anlagerung von G22 zu beobachten, während die Probe 22-mer, ein aus allen vier Basen zusammengesetztes Oligonukleotid, diesem Verlauf nicht folgte: Das Molekül zeigte keinen Anstieg der Bindung bei Zunahme der Salzkonzentration.

Ein Erklärungsmodell für dieses Ergebnis bieten die Untersuchungen von Zimmerman *et al.* (1975), die feststellen, daß Poly-Guanin-Oligonukleotide ab einer NaCl-Konzentration von 400 mM polymere Quadruplex-Strukturen ausbilden. Diese Aggregate, die modellhaft in Abbildung 3.29. gezeigt sind, könnten sich auf der Oberfläche ablagern und ein Signal erzeugen :

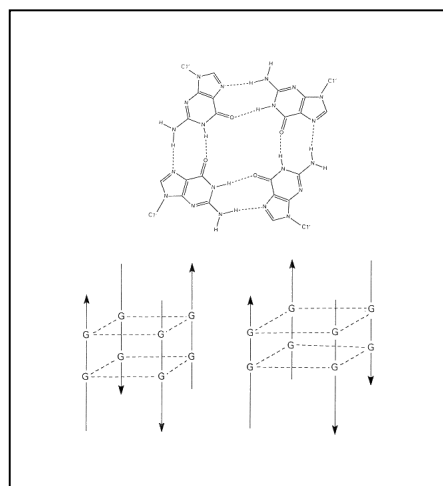


Abb. 3.29.: Aggregatbildung von Poly-Guaninen (aus : Neidle *et al.*, 1994).

In Folge dessen wurden die Hybridisierungsexperimente nur bei Konzentrationen <400 mM NaCl durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Wie erwartet führte der Einsatz der nicht-komplementären Probe 22-mer selbst nach 30 minütiger Inkubationsphase (Fließrate : 0 $\mu\text{l}/\text{min}$) zu keiner signifikanten Veränderung des effektiven Brechungsindex, während das komplementäre Molekül hybridisierte. Abbildung 3.30. faßt die Daten für die Anlagerung erhalten für verschiedene Oberflächen zusammen. Dabei verlief die Hybridisierung jeweils über einen Zeitraum von 30 min:

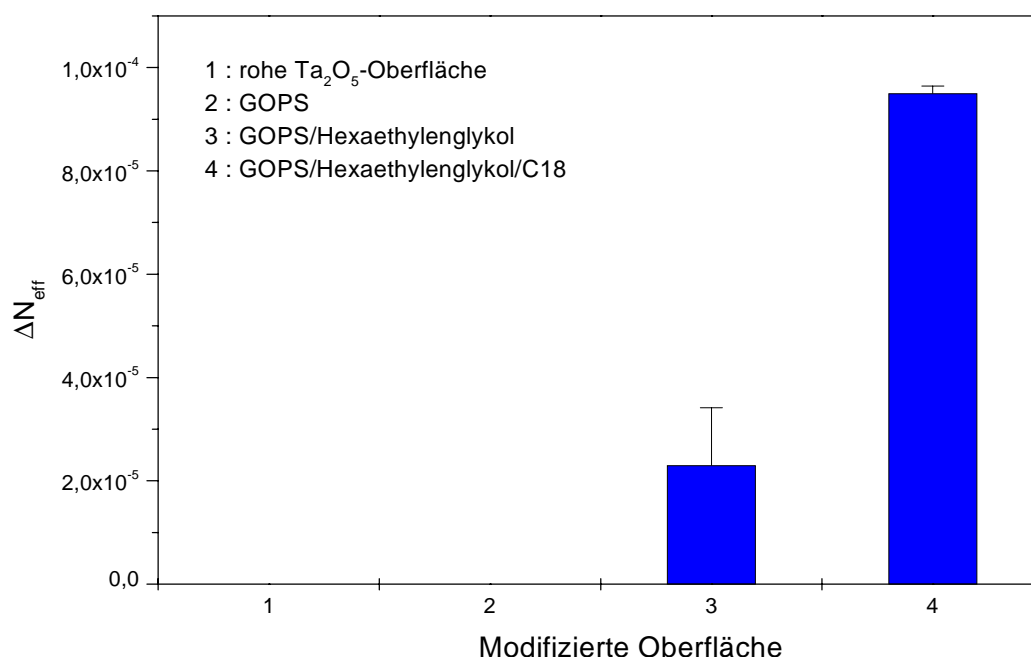


Abb. 3.30.: Bindung von G22 an verschiedene Trägeroberflächen, wobei eine Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.7 μM) in PBS (400 mM NaCl, pH 7.6) verwendet wurde.

Subtrahiert man vom Meßwert für die Anlagerung an die C18-modifizierte Oberfläche den Wert verursacht durch die unspezifische Bindung, erhält man ein $\Delta N_{\text{eff}} = 7.2 \cdot 10^{-5}$. Ein Vergleich mit der Hybridisierung an über Avidin-Biotin gekoppelte Oligonukleotide (s. Kap. III. 2.4.) zeigt für entsprechend gleiche Randbedingungen (Länge, Konzentration) einen um den Faktor 2 höheren Meßwert bei direkt synthetisierten Oligonukleotiden auf Lichtwellenleitern.

2.9.1. Schlußfolgerungen:

Die *Phosphoramiditmethode* erlaubte eine direkte Synthese von Oligonukleotiden auf der Sensoroberfläche. Jedoch konnte die Synthese qualitativ *nicht* verfolgt werden, so daß Aussagen über die Kopplungseffizienz nicht möglich waren. Die Charakterisierung

erfolgte nur über eine spezifische Hybridisierungsreaktion mit komplementärem Oligonukleotid.

- Im Vergleich mit Avidin-Biotin-gekoppelten Sonden zeigte sich bei den direkt synthetisierten Oligonukleotiden ein zweifach höheres Meßsignal bei Anlagerung komplementärer Stränge.

3. Messungen am BIAcore

Ergänzend zu den Messungen am Gitterkoppler wurde das BIAcore als weiteres optisches Sensorsystem zur Untersuchung von Nukleinsäurewechselwirkungen eingesetzt. Vergleichbare Fragestellungen standen deshalb am Anfang der experimentellen Überlegungen im Vordergrund:

- Welche Methode bietet eine effektive Immobilisierung von Avidin oder Streptavidin ?
- Welches Verhältnis von Avidin bzw. Streptavidin zur biotinylierten Sonde erhält man dabei ?
- Welchen Einfluss haben Länge und Konzentration der hybridisierenden Probe ?
- Welchen Einfluß hat die Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers ?
- Wie effektiv ist die Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche ?

Abschließend sollten die Ergebnisse der beiden Sensorsysteme miteinander verglichen und diskutiert werden.

3.1. Immobilisierung von Avidin bzw. Streptavidin auf BIAcore Chips

Neben den kommerziell erhältlichen, vorbeschichteten Streptavidin-Chips (SA) wurden hauptsächlich sog. CM-5 Chips verwendet, die eine carboxymethylierte Dextranmatrix besaßen. Im Gegensatz zur planaren Oberfläche der Gitterkoppler-Lichtwellenleiter war hier aufgrund der Matrix keine adsorptive Bindung des Proteins durchführbar. Daher sollte eine kovalente Kopplung über EDC/NHS mit einer Kopplung an biotinyliertem Dextran verglichen werden. Es sollte ebenso ermittelt werden, ob das Protein von der biotinylierten Oberfläche z. B. durch den Einsatz von Proteasen entfernt werden konnte. Damit wäre u. U. eine Wiederverwendung der Chips denkbar, da deren Biotinmodifikation intakt bleiben würde.

Über EDC/NHS (s. Kap. II. 2.1.2.3.) voraktivierte Carboxylfunktionen der Dextrane reagierten mit zugänglichen Aminogruppen des Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung. Das Sensorsystem ermöglichte die Verfolgung der Bindung des Proteins auf

allen vier Fließzellen. Abbildung 3.31. zeigt ein dafür exemplarisches Beispiel. Die Aktivierung mit dem Carbodiimid/NHS-Gemisch ist nicht gezeigt, bewirkte jedoch einen mittleren Signal von 500 RU:

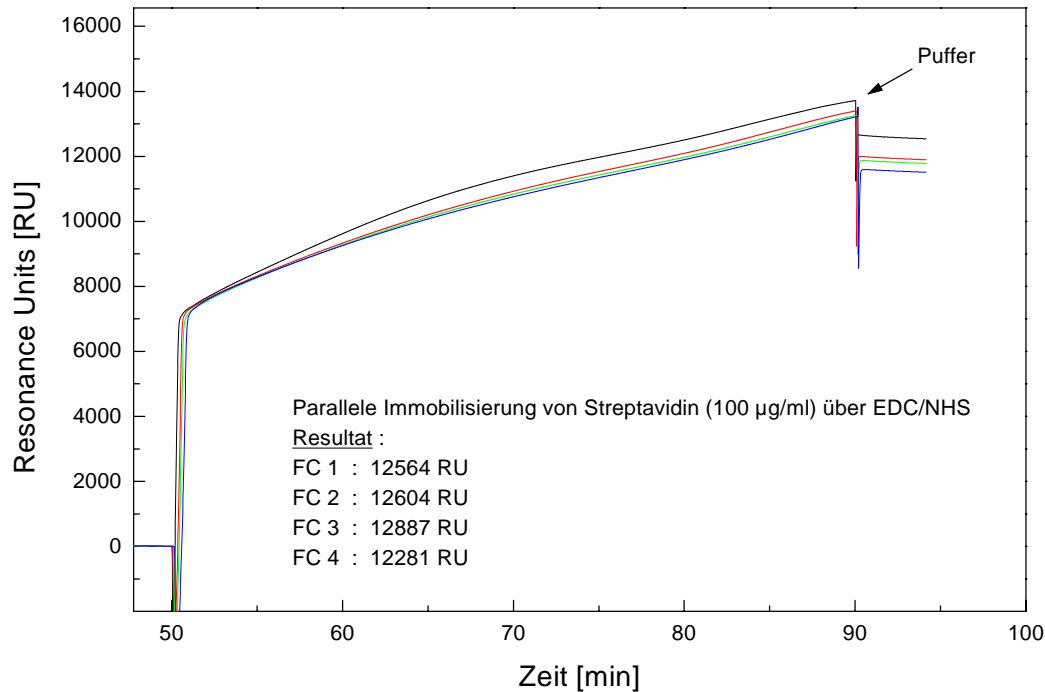


Abb. 3.31.: Beispiel für die Bindung von Streptavidin (100 µg/ml) an eine EDC/NHS-aktivierte carboxymethylierte Oberfläche.

Eine parallele Immobilisierung auf einem Chip führte zu vergleichbaren Werten der Oberflächenbeladung mit Abweichungen bis maximal 2.5-5 %. Jedoch wurde bei Vergleich verschiedener Chips miteinander eine größere Streuung festgestellt. Die Signale für die Proteinanlagerungen variierten um $12.2 (\pm 2.2) \text{ ng/mm}^2$, was einer Oberflächenbeladung von $0.15 - 0.22 \text{ pmol/mm}^2$ entsprach. Die Reproduzierbarkeit der Chips untereinander war bei Abweichungen bis zu 35 % gering. Da die Proteinmenge jedoch stets ins Verhältnis zur anschließenden Bindung von biotinyliertem Sonden-Oligonukleotid gesetzt wurde, fiel die Streuung nur bei der Bestimmung der Nachweisgrenze der Hybridisierung ins Gewicht.

Vergleicht man die gezeigte Immobilisierung des Proteins über *EDC/NHS* mit der Bindung an biotinyliertem Dextran, zeigte sich, daß bei letzterer Methode ca. 50 % weniger Streptavidin fixiert werden konnte. Abbildung 3.32. demonstriert, daß die zwar sehr schnelle Anlagerungsreaktion innerhalb weniger Sekunden verlief, jedoch ein Sättigungswert von 7 ng/mm^2 nicht überschritten wurde:

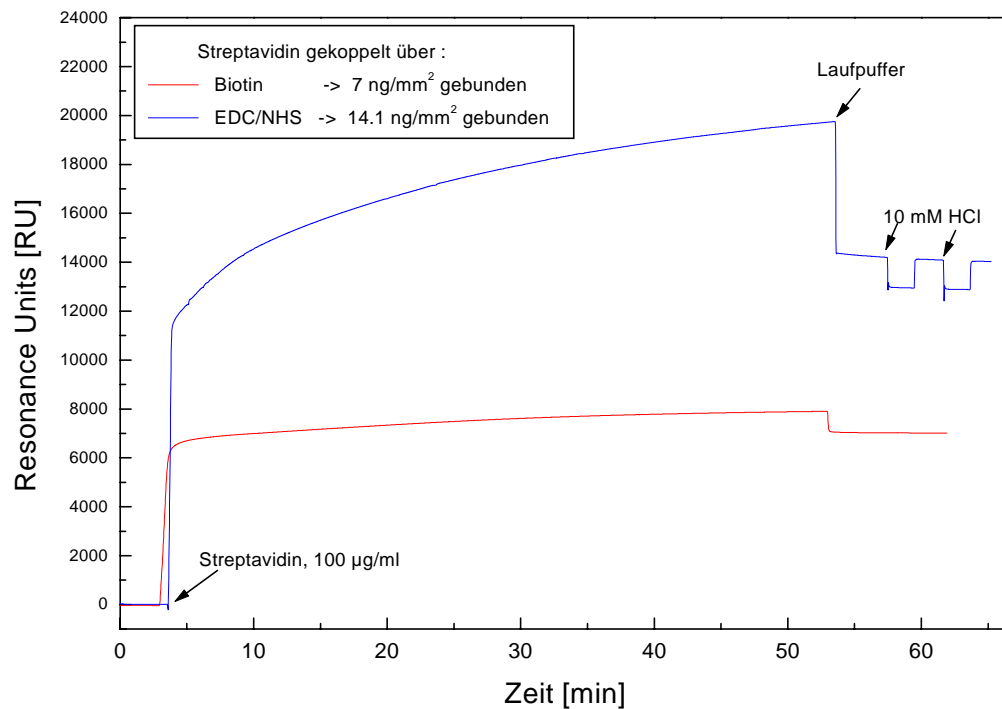


Abb. 3.32. : Vergleich der Bindung von Streptavidin (100 µg/ml) an biotinylierte bzw. EDC/NHS aktivierte Oberfläche.

Neben der geringeren Bindungskapazität des via Biotin gebundenem Avidin wurde festgestellt, daß nur geringe Mengen an biotinylierten Sonden-Molekülen an die Proteine binden konnten, was darauf hin deutet, daß durch die Bindung an die biotinylierte Dextranmatrix die meisten Bindungstaschen des Proteins bereits abgesättigt waren.

3.2. Bindung von biotinylierten Sonden

Ziel der Untersuchungen war, die Konzentration zu ermitteln, bei der die Dichte an biotinylierter Sonde auf der Sensoroberfläche möglichst groß war, um bei der nachfolgenden Hybridisierungsreaktion mit Proben-Oligonukleotiden eine niedrige Nachweisgrenze zu erhalten.

Zu Beginn wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Sensorsignal ermittelt, wozu steigende Konzentrationen eines biotinylierten 22-mers (BiotinRNA4) über eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche geleitet wurde.

Abbildung 3.33. zeigt einen BIAcore-Meßzyklus, der die Anlagerung von 10 nM (600 fmol/60 µl Auftragsvolumen) bis 200 nM (12 pmol/60 µl) biotinylierter Sonde BiotinRNA4 demonstriert. Ab 100 nM (6 pmol/60 µl) stellte sich ein Sättigungseffekt ein, d.h. trotz Zunahme der Konzentration der biotinylierten Sonden gab es keine weitere Zunahme des Sensorsignals :

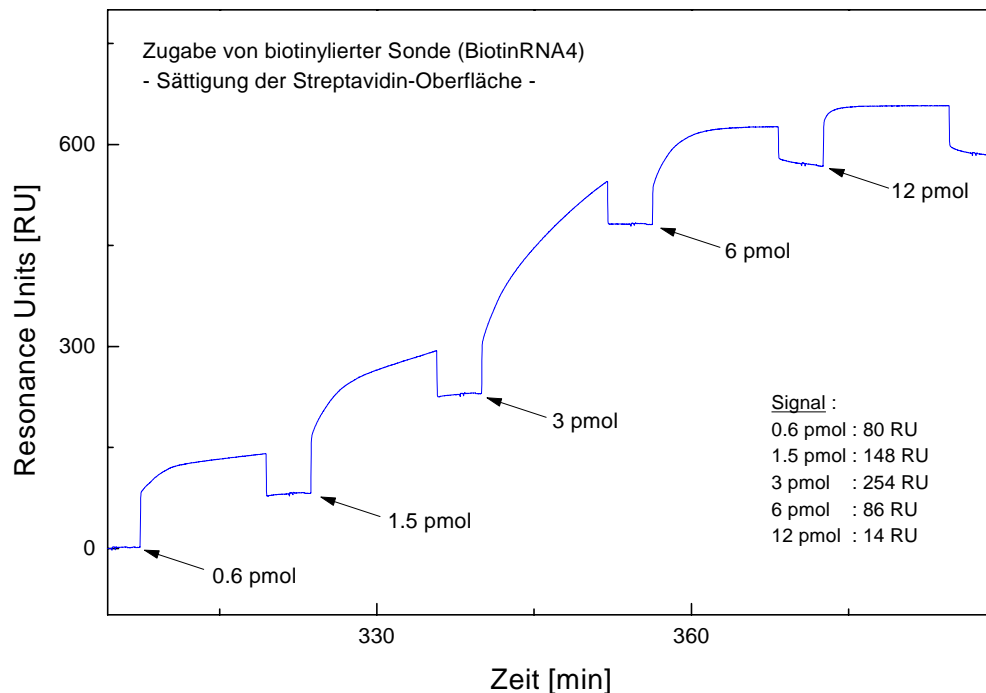


Abb 3.33.: Zugabe von steigenden Konzentrationen an biotinylierter Sonde auf eine mit 12.7 ng/mm² Streptavidin vorbeschichtete Fließzelle. Das Volumen der injizierten Sonden betrug jeweils 60 µl.

Abb. 3.34. faßt zwei der oben dargestellten Meßzyklen zusammen: Auf unbenutzten, mit Streptavidin vorbeschichteten Fließzellen wurden sequentiell steigende Konzentrationen an biotinylierter Sonde (je 60 µl) injiziert. Gezeigt ist die additive Zunahme des Sensorsignals durch Zugabe steigender Konzentrationen an biotinylierten Oligonukleotids.

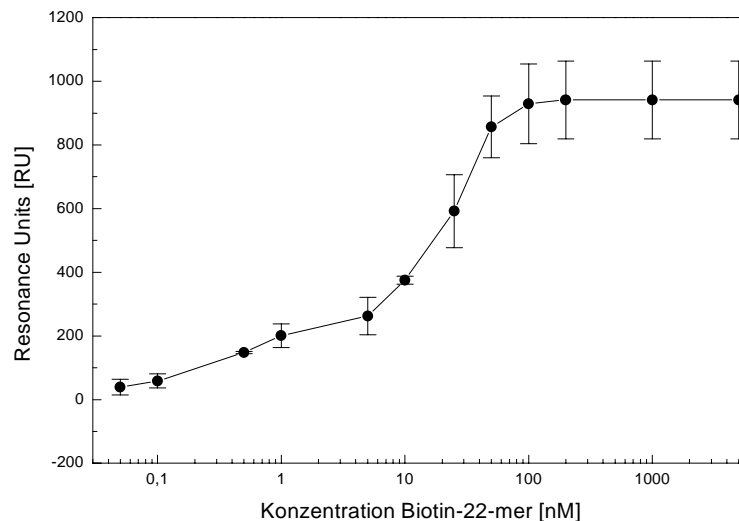


Abb. 3.34: Verlauf des BIAcore-Sensorsignals bei additiver Zugabe an steigenden Konzentrationen von biotinylierten Oligonukleotiden.

Deutlich zu erkennen war der Sättigungsbereich, der bei den beiden in dieser Graphik zusammengefaßten Meßzyklen ab ca. 100 nM erreicht war.

Die folgende Abbildung gibt das Bindungsverhältnis von Streptavidin zu biotinyliertem 22-mer wieder. Dabei wurde bei sequentiell steigender Zugabe von biotinylierten Oligonukleotiden ein durchschnittliches Verhältnis von Protein zum Bindungspartner von 1 : 0.6 gefunden. Die Zugabe einer hohen Konzentration an biotinylierten Oligonukleotid in einer Probe bewirkte jedoch ein höheres Bindungsverhältnis (s. u.).

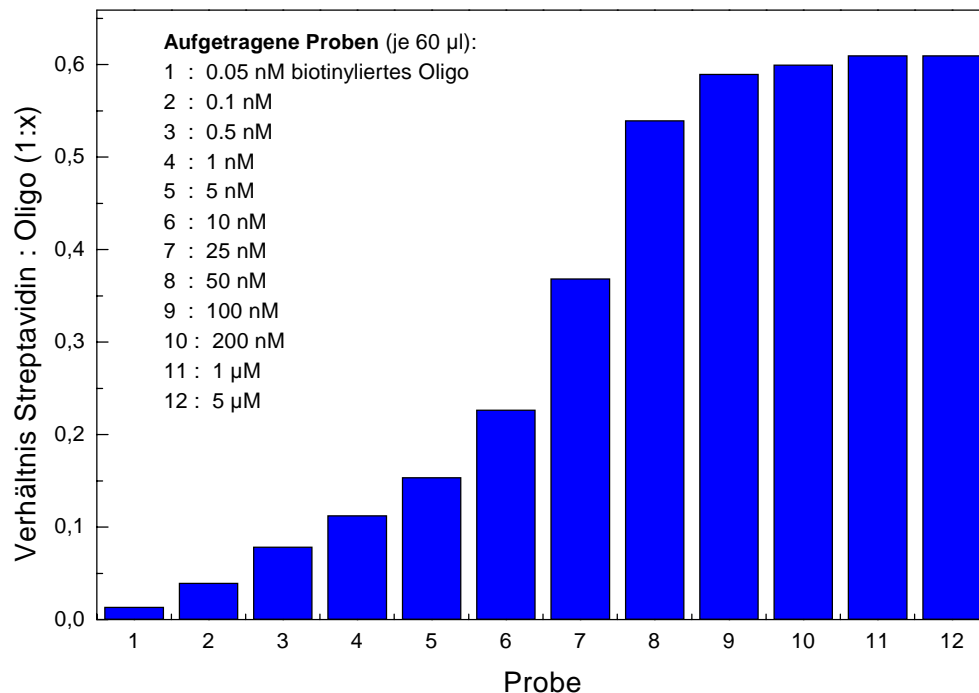


Abb. 3.35.: Bindungsverhältnis von Streptavidin zu biotinylierten 22-mer (Biotin-RNA4) bei Auftrag von steigenden Konzentrationen an Oligonukleotid. Bezogen sind die Werte auf x Moleküle Oligo pro 1 Molekül Streptavidin.

Für die nachfolgenden Hybridisierungsmessungen war eine hohe Dichte an Sonden auf der Oberfläche entscheidend für die Nachweisgrenze. Daher wurde eine hohe Konzentration von 5 nmol/ml eingesetzt, um eine Absättigung der Sensoroberfläche zu erhalten.

Das beschriebene Verhältnis von biotinylierter Probe zum Avidin variierte bei den Messungen stark. Eine Mittelwertsbestimmung über 8 Messungen mit hohen Konzentrationen an Sonde ergab pro Protein 1.8 ± 0.6 biotinylierte Oligonukleotide. Besonders hohe Avidinbeladungen (> 14.000 RU) zeigten dabei die niedrigsten Bindungsverhältnisse, wobei die größere Menge an Protein den Zugang der Bindungstaschen sterisch behindern könnte. Das niedrigere Bindungsverhältnis wurde jedoch durch die höhere Beladung ausgeglichen, da insgesamt mehr Bindungstaschen zur Verfügung standen so daß absolut gesehen mehr Sonden immobilisiert werden konnten.

3.3. Regenerierungen am BIAcore

Um Sensoroberflächen nach erfolgter Reaktion wieder für eine weitere Messung vorzubereiten, muß nach jedem Zyklus regeneriert werden. Zur Auftrennung der gebildeten Duplex-DNA aus Sonde und Probe wurde mit 50 mM NaOH gespült, da die Verwendung von 10 mM NaOH nur eine unvollständige Denaturierung der Doppelstränge erzielen konnte.

Um die Effektivität der Regenerierung zu testen, wurde auf einer Sensoroberfläche mit Streptavidinbasis und biotinyliertem 18-mer (BiotinRNA3) mehrfach hintereinander eine je 1 μ M Lösung (Volumen 60 μ l) mit komplementärem Oligo (18-mer, compRNA3) gegeben, wobei zwischen den Hybridisierungen regeneriert wurde. Abbildung 3.36. gibt den Verlauf der Messung wieder.

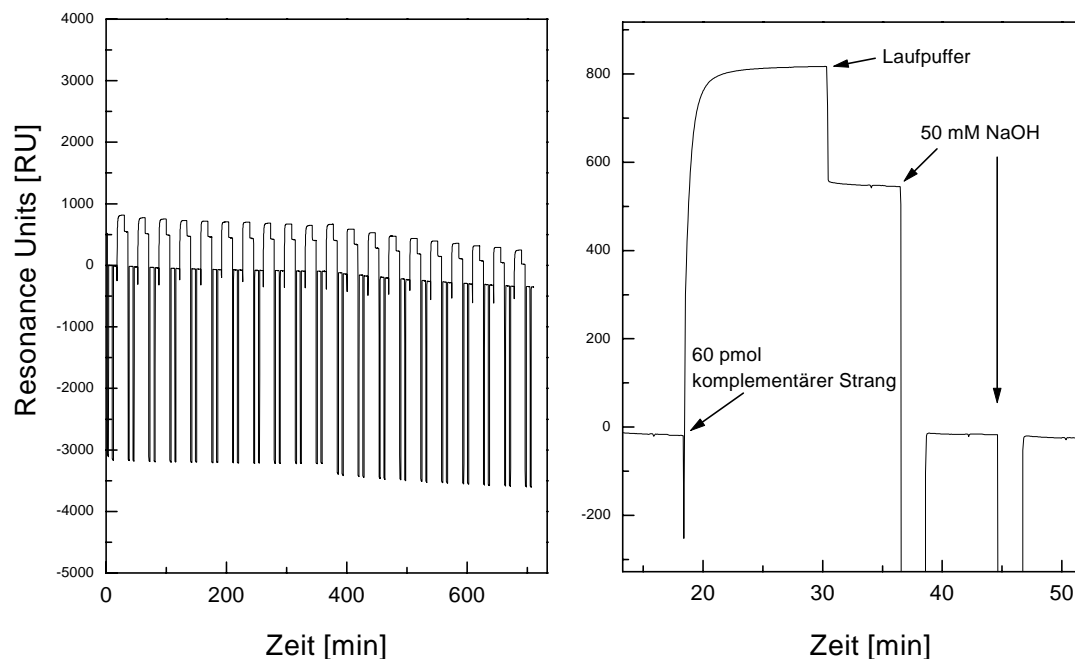


Abb. 3.36.: Hybridisierung und Regenerierung am BIAcore: Nach einer 12-minütigen Hybridisierungsreaktion mit 1 μ M compRNA3 (18-mer, Injektionsvolumen: 60 μ l in 0.6xSSC) erfolgten 2x2-minütige Spülschritte zur Regenerierung der Sensoroberfläche. Links gezeigt ist der Verlauf über 20 Meßzyklen, während das rechte Schema einen einzelnen Zyklus vergrößert darstellt.

Die Messungen machten deutlich, daß bereits ein Spülschritt mit 50 mM NaOH für 2 min ausreichte, um den gebildeten Doppelstrang vollständig zu denaturieren. Über den Verlauf der Messungen (ca. 12 h) zeigte sich eine Reduktion der Basislinie um ca. 350 RU, die durch die Verwendung der Lauge bedingt war.

Ein wesentliches Ergebnis der Meßzyklen war das abnehmende Signal für die Hybridisierung des komplementären Strangs. Die folgende Abbildung faßt zusammen, welche Konsequenz die mehrfachen Regenerierungsschritte mit Natronlauge hatten. Zwei verschiedene Meßzyklen mit 13 bzw. 20 Schritten wurden dafür unter gleichen Randbedingungen (T, Salzkonzentration, identische Oligonukleotide) durchgeführt, jedoch wurde jeweils eine neue unbenutzte Fließzelle verwendet:

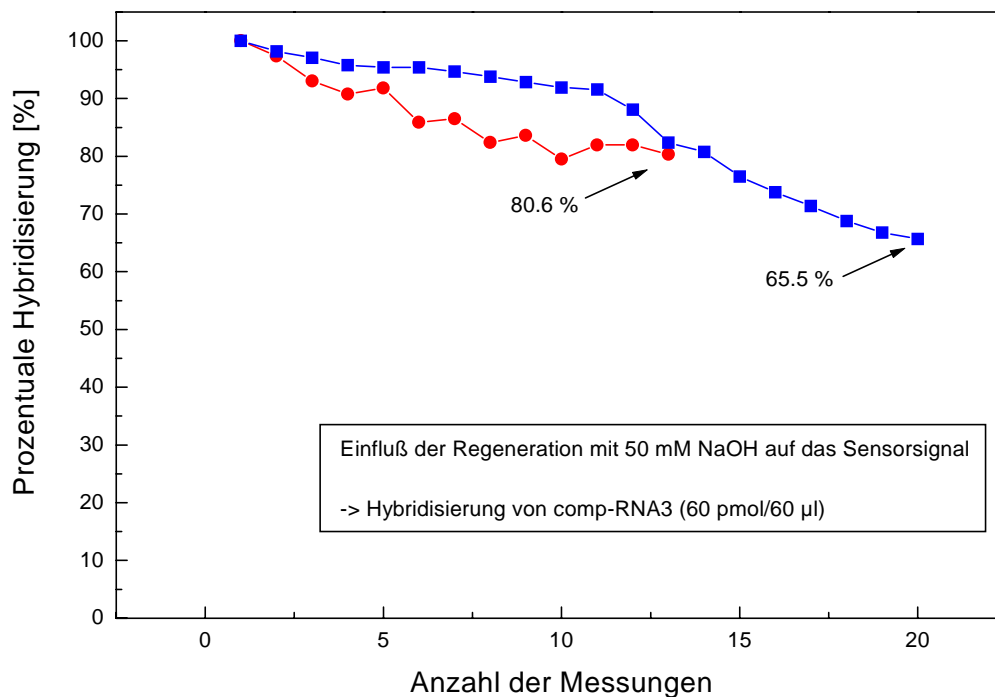


Abb. 3.37.: Prozentuale Abnahme des BIAcore-Sensorsignals bei Meßzyklen bestehend aus mehrfacher Hybridisierung mit 1 µM komplementärem 18-mer und anschließender Regenerierung mit 50 mM NaOH (Sensoroberfläche vorbeschichtet mit Streptavidin-Biotin-RNA3).

Nach 13 Zyklen waren beide gezeigten Meßsignale um ca. 20 % reduziert, während nach 20 Messungen das Signal der Hybridisierung des komplementären Strangs sogar auf ca. 65 % sank (Bei den Auswertungen wurde die sinkende Basislinie berücksichtigt, so daß die Signale ein effektives Hybridisierungssignal widerspiegeln). Der unterschiedliche Verlauf der analogen Messungen veranschaulichte die limitierte Reproduzierbarkeit der Fließzellen untereinander.

Vergleicht man die Reduktion der Basislinien durch die Einwirkung der Natronlauge auf die Sensoroberfläche, dann zeigte sich kein weitgehend kongruenter Verlauf. Vielmehr wurde

festgestellt, daß die Reduktion der Basislinie mit der Abnahme der Hybridisierungseffektivität korrelierte. Bei beiden in Abbildung 3.37. gezeigten Meßzyklusverläufen konnte man annähernd deckungsgleiche Verläufe für das Hybridisierungssignal und die dazugehörige Basislinienabnahme aufzeichnen. Ursachen dieses Meßverhaltens werden in Kap. IV. 3. diskutiert. Als Konsequenz aus dem abnehmenden Hybridisierungssignal mit der Anzahl der Regenerierungen wurden für Untersuchungen zur Hybridisierung verschiedener Proben jeweils neue Fließzellen verwendet.

3.4. Hybridisierungsreaktionen am BIAcore

Um den Nutzen des SPR-Sensors zur direkten Beobachtung von Hybridisierungsreaktionen zu charakterisieren, wurde die Abhängigkeit des Sensorsignals von der Länge der Probe und deren Konzentrationen untersucht. Weiterhin sollte die Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers variiert werden, um eventuelle Einflüsse zu ermitteln.

Zuerst wurde jedoch ermittelt, ob signifikante *unspezifische Bindung* eines nicht-biotinylierten Oligonukleotids an der Streptavidinmatrix auftrat. 4 Messungen mit einer 1 µM-Lösung eines 18-mers (compRNA3) ergab einen Durchschnittswert für die unspezifische Bindung von 35.5 (± 7.5) RU.

Die spezifische Hybridisierung der gleichen Konzentration an eine komplementäre, oberflächenfixierte Sonde ergab 670 RU, so daß die unspezifische Bindung an die Matrix nur ca. 5 % ausmachte.

Die nächste Abbildung zeigt die Untersuchung *unspezifischer Hybridisierung* mit Hilfe einer Sonde (BiotinRNA3) auf der Oberfläche des Sensors und zweier Proben: je ein komplementäres (compRNA3) und ein nicht-komplementäres 18-mer (comp forward pUC):

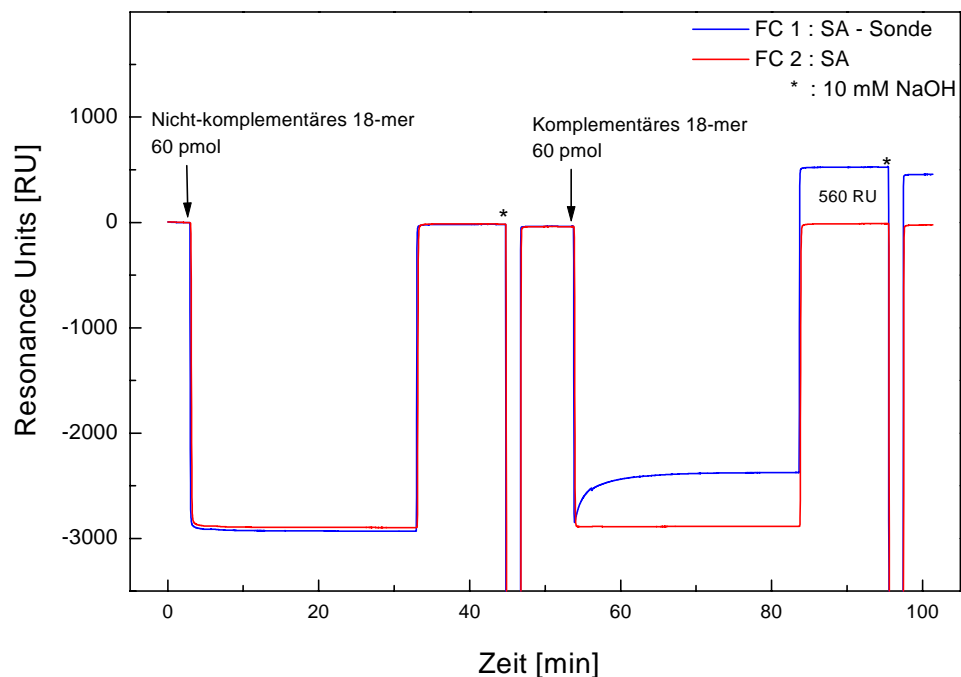


Abb. 3.38.: Zur Untersuchung unspezifischer Hybridisierungen wurde im ersten Meßzyklus ein nicht-komplementäres 18-mer (comp forward pUC, 60 pmol, in 0.6xSSC) über eine mit 150 fmol/mm² Sonde vorbeschichtete Oberfläche geströmt. Nach einer Inkubationsphase und einem Spülschritt mit 10 mM NaOH erfolgte die spezifische Hybridisierung eines komplementären Stranges (compRNA3, 60 pmol, in 0.6xSSC). Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Anlagerung an die Referenzzelle (Streptavidinmatrix), während die blaue Kurve die Änderung der Massenbeladung auf der Sonden-Zelle wiedergibt (560 RU). Laufpuffer bei der Messung war 2 x SSC (T=28°C).

Das gewählte Beispiel verlief unter stringenten Bedingungen, d.h. die Salzkonzentration (0.6xSSC) und Temperatur (28°C) waren optimal für die Hybridisierung eingestellt. Der Puffersprung zu niedrigeren RU-Werten vom Zeitpunkt der Inkubationsphase korrelierte mit dem niedrigeren Brechungsindex des Hybridisierungspuffers, da die Salzkonzentration von 330 mM (2 x SSC, Spülpuffer) auf 99 mM Na⁺ (0.6 x SSC, Hybridisierungspuffer) reduziert wurde. Das Signal der Referenzzelle, beschichtet mit einer Streptavidinmatrix, stieg bedingt durch unspezifische Anlagerung des Proben-Oligonukleotids um lediglich 26 RU.

Zusammenfassend konnte man aus den ersten Experimenten schließen, daß die Wechselwirkung der Oligonukleotide ohne Biotinlabel mit der Streptavidinmatrix sehr gering war (< 5% im Vergleich zu Messungen mit komplementärer Sonde) und Hybridisierungsereignisse leicht beobachtbar waren. Signifikant war der Unterschied zwischen dem komplementären Oligonukleotid (Signal : 560 RU) und dem nicht-komplementären Strang, der keine Anlagerung zeigte.

3.5. Einfluß von Länge des Probenoligonukleotids auf das Sensorsignal

Abbildung 3.39. demonstriert eine Mehrfachmessung der Hybridisierung von 8, 12, und 18-meren bei 28°C auf einer mit komplementärer Sonde beschichteten Sensoroberfläche. Die Regenerierung erfolgte nach jedem Hybridisierungsschritt durch 50 mM NaOH. Deutlich zu erkennen war die geringe Änderung des Signals durch die Anlagerung des 8-mers nach der Pufferspülung. Das 12 bzw. 18-mer erzeugen dagegen eine signifikante Signalerhöhung:

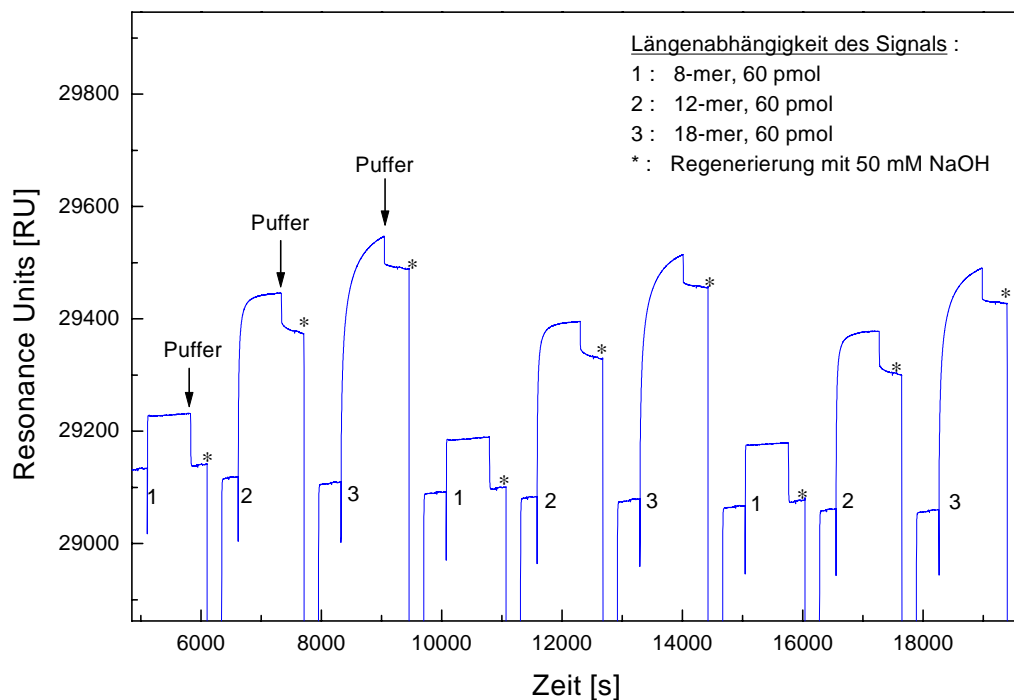


Abb. 3.39.: Einfluß der Länge des Oligonukleotids auf das Sensorsignal. Dabei wurde jeweils eine 1 μ M Lösung (60 μ l Volumen) eines 8 (comp8RNA), 12 (comp12RNA), bzw. 18-mers (compRNA3) über eine mit komplementärer Sonde (18-mer, BiotinRNA3) vorbeschichtete Fließzelle geleitet. Die Regenerierung der Oberfläche erfolgte mit 50 mM NaOH; der Laufpuffer war 0.6xSSC.

Abbildung 3.40. faßt fünf unterschiedliche Längen von hybridisierenden Oligonukleotiden zusammen.

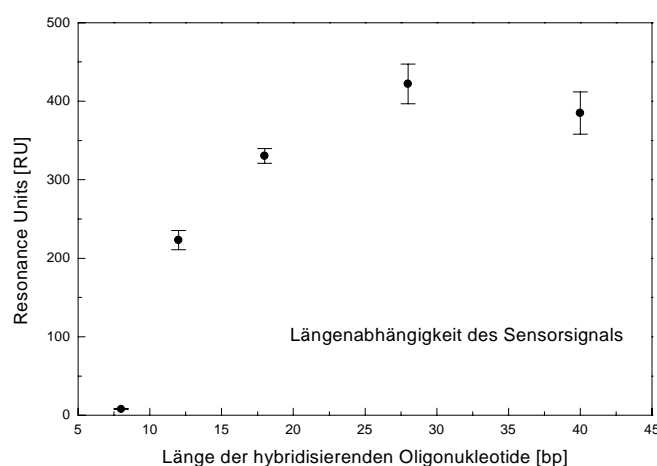


Abb. 3.40.: Abhängigkeit des Sensorsignals von der Länge des hybridisierenden Oligonukleotids: die 8, 12 und 18-mer (je 60 pmol, Volumen: 60 μ l) binden dabei an eine mit BiotinRNA3 (18-mer) vorbeschichtete Oberfläche, während das 28 und 40-mer an eine mit Biotin 24-mer beladene Oberfläche hybridisieren. Unspezifische Bindungen an die Streptavidinmatrix wurden jeweils subtrahiert.

Die folgende Tabelle zeigt, warum das Signal des 8-mers im Vergleich zum 12-mer so gering war: Nur ca. 2 % der zur Verfügung stehenden Sonden waren mit der Probe hybridisiert, gegenüber ca. 40 % beim 12-mer. Ursache dafür war der nach Gleichung (1) auf 1.1 °C berechnete Schmelzpunkt für das 8-mer (bei 0.6 x SSC). Bei 28°C Hybridisierungstemperatur war die Dissoziationsrate der gebildeten Duplex sehr hoch, so daß (da thermodynamisch ungünstig) kaum Hybride vorlagen. Das 12-mer hatte dagegen einen Schmelzpunkt von 29.2°C, der knapp überhalb der Reaktionstemperatur lag.

Länge an Probenoligo	Hybridisierungsverhältnis (Ø)
8-mer	2.2 %
12-mer	39.8 %
18-mer	37.2 %
28-mer	13.8 %
40-mer	8.5 %

Tab. 3.9.: Durchschnittliches Hybridisierungsverhältnis von Probenoligonukleotiden unterschiedlicher Länge an biotinyliertem Sonden-Oligonukleotid. Die Prozentwerte geben jeweils Aufschluß darüber, wieviel Prozent der oberflächen-gebundenen Sonden mit der Probe hybridisiert sind (s. Kap. II. 2.1.3., Gleichung (7)).

3.6. Einfluß der Konzentration der Probe auf das Sensorsignal

Um die Abhängigkeit des Sensorsignals von der Probenkonzentration zu evaluieren, wurde das 18-mer compRNA3 auf der Sensoroberfläche in steigenden Konzentrationen hybridisiert. Abbildung 3.41 zeigt beispielhaft eine Meßkurve, die für einen Zyklus nach allgemeiner Vorschrift in Kap. II. 2.1.2.2. aufgenommen wurde. Dabei war der Hybridisierungspuffer 0.6 x SSC, während der Laufpuffer eine höhere Salzkonzentration besaß (2 x SSC, 330 mM Na⁺). Daher waren die Signale für die Grundlinienverschiebung bedingt durch die Masseanlagerung hier im oberen Bereich der Kurve abzulesen, während die Anlagerungskinetik im unteren Bereich der Kurve zu verfolgen war.

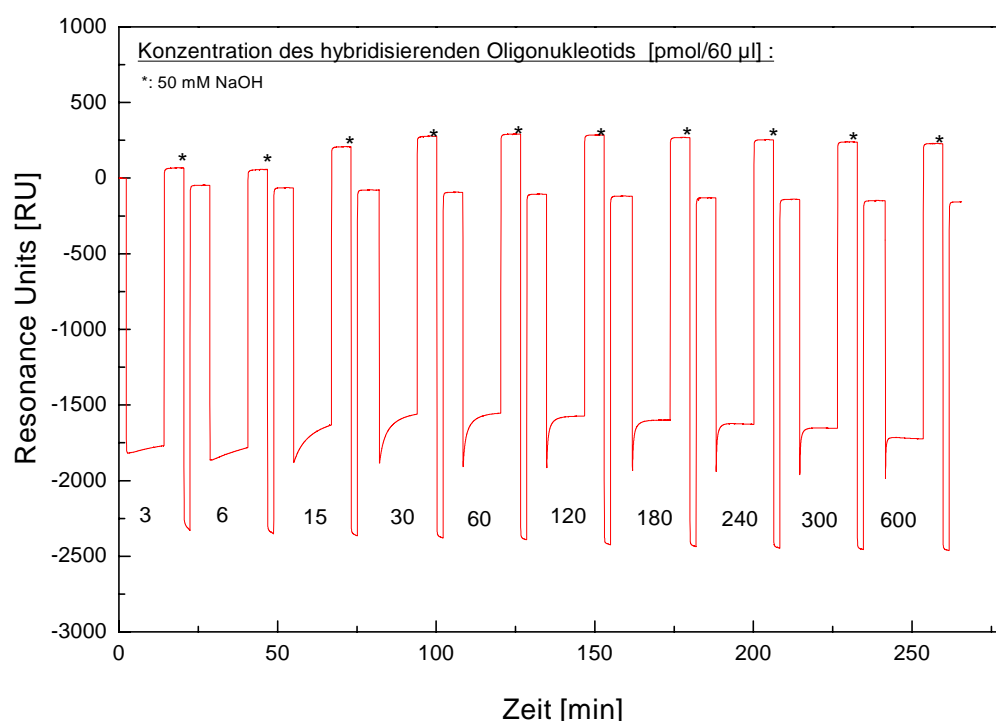


Abb. 3.41. : Hybridisierung von steigenden Konzentrationen an 18-mer compRNA3 an eine mit ca. 100 fmol/mm² (ca. 600 RU) mit BiotinRNA3 vorbeschichteten Fließzelle. Die gewählte Temperatur war 28°C, Laufpuffer 2 x SSC, während als Hybridisierungspuffer 0.6 x SSC benutzt wurde.

Abb. 3.41 zeigte eine durch die Regenerierung mit NaOH bedingte abnehmende Grundlinie um ca. 150 RU von der ersten zur letzten Messung. Wahrscheinliche Ursache war eine in Kap. IV. 3 diskutierte Abspülung von Sonden-Molekülen von der Sensoroberfläche, die bewirkte, daß nach einer Reihe von NaOH-Spülungen immer weniger Proben-Moleküle hybridisieren konnten.

Abbildung 3.42. gibt die Meßergebnisse zweier Zyklen in anderer Form wieder. Die gezeigten Resultate wurden hier auf unterschiedlichen Fließzellen erhalten: Die obere Kurve zeigt die Daten der Hybridisierung auf einer Zelle mit 120 fmol/mm^2 Sonde, während die untere, blaue Kurve durch Hybridisierung an eine mit 100 fmol/mm^2 beschichtete Oberfläche entstand. Deutlich zu erkennen war, daß der Sättigungswert bei beiden Durchgängen ab ca. 100 pmol erreicht war. Die Menge entsprach einem Signal von 385 bzw. 606 RU. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sondenbeladung konnte man berechnen, daß im ersten Fall bei Erreichen des Sättigungsgleichgewichts ca. 67 % der Sonden-Moleküle hybridisiert waren, während im zweiten Fall ca. 87 % als Duplex vorlagen:

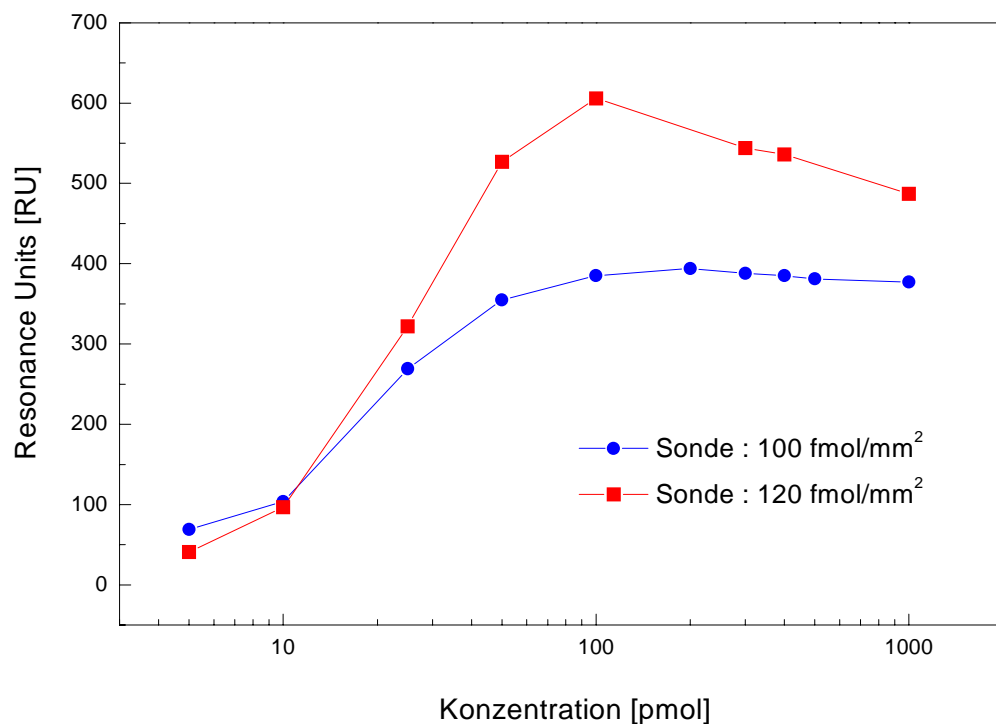


Abb. 3.42.: Zwei Meßzyklen, die auf verschiedenen Fließzellen (Biotin-RNA3-Beschichtung 100 bzw. 120 fmol/mm^2) durchgeführt wurden. Die Bedingungen der Hybridisierung waren jeweils identisch (s. Abb. 3.41.).

Nachzuweisen war eine Konzentration von 50 nM (60 μl Probevolumen) 18-mer, die eine Anlagerung von ca. 70 ng/mm^2 bewirkten.

3.7. Einfluß der Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers auf das Sensorsignal

Die Salzkonzentration hatte großen Einfluß auf die Hybridisierung, da die Kationen die negativen Ladungen der Phosphatgruppen abschirmen konnten, so daß die Bildung von

Doppelsträngen begünstigt wurde (s. Kap. I. 4.2.). Die veränderte Anlagerungsgeschwindigkeit und Gleichgewichtseinstellung wurde mit Hilfe des BIAcore-Gerätes an 7 verschiedenen Salzkonzentrationen gezeigt (Abbildung 3.43.).

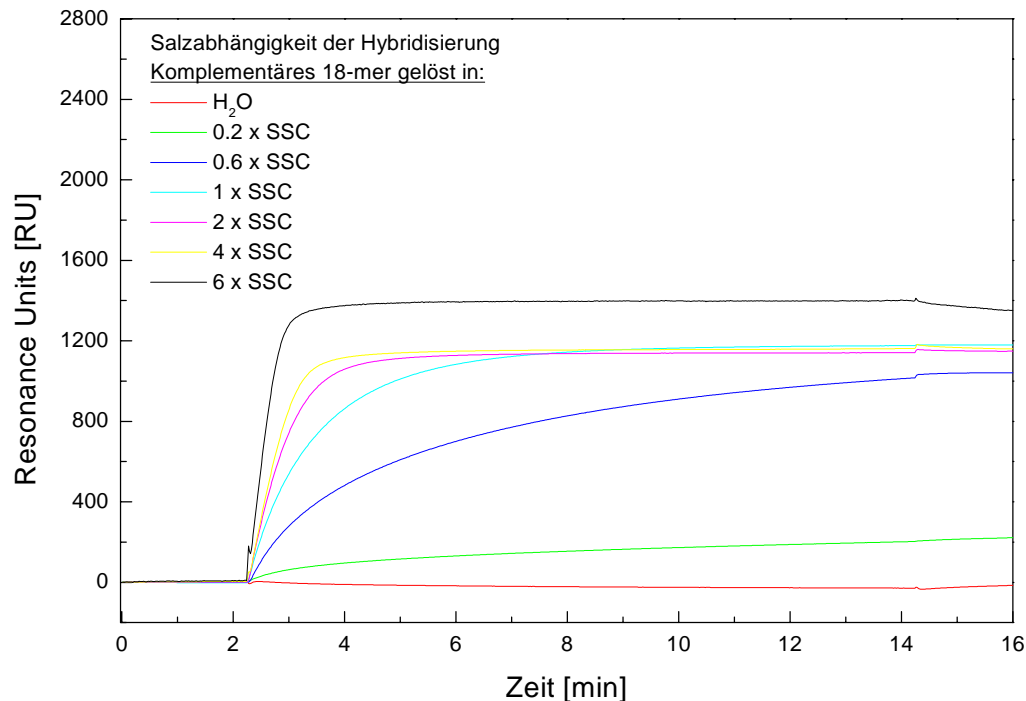


Abb. 3.43.: Salzabhängigkeit der Hybridisierung: 60 pmol (1 μ M) eines komplementären Stranges (18-mer, compRNA3) wurde in verschiedenen Puffern bei 28°C hybridisiert. Oberflächengebunden war die Sonde BiotinRNA3 (ca. 250 fmol/mm², 1440 RU).

Deutlich zu erkennen waren die unterschiedlichen Hybridisierungsgeschwindigkeiten und Absolutsignale für die Hybridisierungen nach jeweils 12 min. Während bei Verwendung einer hohen Salzkonzentration von 6xSSC (~1M NaCl) sich die Reaktion bereits nach ca. 2 min in einem Gleichgewichtszustand befand, stellte sich bei 1xSSC (0.166 M NaCl) das Hybridisierungsgleichgewicht erst nach ca. 9 min ein. Tabelle 3.10. faßt die Resultate des Experiments noch einmal zusammen. Dabei erfolgte die Untersuchung auf einem Sensorchip, der mit 0.25 pmol/mm² Sonde (18-mer, BiotinRNA3) vorbeschichtet war.

Salzkonzentration [mM]	T _m [°C]	Hybridisierte Probe [fmol/mm ²]	Prozent Sonde : Probe [%]
0	-	0	0
33 (0.2 x SSC)	39.9	34.5	13.8
99 (0.6 x SSC)	47.8	180	71.6
165 (1 x SSC)	51.5	203	81.2
330 (2 x SSC)	56.5	198	79.1
660 (4 x SSC)	61.5	200	80.3
990 (6 x SSC)	64.4	233	93.3

Tab. 3.10.: Salzabhängigkeit der Hybridisierung: Auf der Sensoroberfläche waren ca. 250 fmol/mm² Sonden immobilisiert. Aus den erhaltenen Signalen für die Hybridisierung erhielt man die gebundene Menge an Probe und konnte bestimmen, wieviel Prozent der Sonden-Moleküle nach der Gleichgewichtseinstellung hybridisiert waren. Der Schmelzpunkt T_m der Proben wurde nach Gleichung (1) berechnet (s. Kapitel I. 4.2.).

Für die Proben von 0.6 x SSC bis 6 x SSC kann man die *Halbwertszeit der Hybridisierung* bestimmen, die hier der benötigten Zeit bis zur Erreichung der Hälfte des Sättigungswertes entspricht. Kleinere Salzkonzentrationen zeigten im Rahmen des Zeitfensters von 12 min lediglich eine Signalzunahme, jedoch kein Sättigungsplateau und mußten daher vernachlässigt werden :

Salzkonzentration [mM]	t _{1/2} [s]
99 (0.6 x SSC)	68
165 (1 x SSC)	48
330 (2 x SSC)	32
660 (4 x SSC)	27.5
990 (6 x SSC)	19

Tab. 3.11.: Bestimmung der Halbwertszeit der Hybridisierung t_{1/2} für verschiedene Salzkonzentrationen (Dafür wurde der Sättigungswert für die geringste Salzkonzentration von 0.6 x SSC extrapoliert).

Nach Gleichung (2) (Kap. I. 4.3.) berechnet sich die *Halbwertszeit der Hybridisierung* für das gewählte 18-mer (1 µM) auf 8.4 s. Der theoretisch berechnete Wert geht allerdings von einer Salzkonzentration zwischen 0.4-1.0 M Na⁺, sowie von einer Hybridisierungstemperatur von T_{hyb} = T_m-25 °C, so daß die Formel hier nur als erste Näherung angewendet werden sollte.

3.8. Schlußfolgerungen:

- Die kovalente Bindung von Streptavidin an die Dextranmatrix via EDC/NHS war vorteilhafter als die Immobilisierung über biotinyliertes Dextran, da eine höhere Beladungsdichte von ca. 12 ng/mm² statt ca. 7 ng/mm² gefunden wurde.
- Über Biotinmoleküle an die Dextranmatrix gekoppeltes Streptavidin war nur im geringem Umfang in der Lage, biotinylierte Oligonukleotide zu binden, was u. U. auf die Absättigung der Bindungstaschen zurückgeführt werden kann.
- Unspezifische Bindung von nicht-biotinyliertem Oligonukleotid an die Streptavidinmatrix war gering.
- Längenabhängigkeit: Hybridisierungsreaktionen waren ab 12 bp langen Sequenzen beobachtbar. Hybridisierungen von kurzen 8-meren konnten aufgrund der niedrigen Schmelztemperatur nicht verfolgt werden.
- Konzentrationsabhängigkeit: 3 pmol [50 nM] eines komplementären 18-mers reichten aus, um ein signifikantes Signal zu erzeugen.
- Salzabhängigkeit: Der optische Biosensor ermöglichte die Charakterisierung der Salzabhängigkeit der Hybridisierung, wobei sich zeigte, daß *ohne* Salz keine Hybridisierung auftrat. Steigende Na⁺-Konzentrationen veränderten Kinetik und Effektivität der Reaktion.
- Regenerierung: Eine 2-minütige Spülung mit 50 mM NaOH war zur vollständigen Regenerierung der Sensoroberfläche geeignet. Das Signal für die Hybridisierung nahm jedoch nach 20 Zyklen auf ~65 % vom Ausgangswert ab. Ursache könnte Abspülen von oberflächengebundener Sonde sein.

4. Applikation I: Spezifischer Nachweis des Bakteriums *Escherichia coli* DH5 α

Für den spezifischen Bakteriennachweis mit optischen Sensoren wurde eine 18 bp lange Sequenz ausgewählt, die komplementär zum bakteriellen Plasmid pUC 19 war. Die Sonde sollte auf die Sensoroberfläche immobilisiert werden und als Affinitätskomponente für die Hybridisierung dienen. Folgende Fragestellungen prägten die experimentelle Vorgehensweise:

- Führt die Verwendung des aufgereinigten und anschließend denaturierten Plasmids pUC 19 zu einem Sensorsignal ? Ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit ausreichend ?
- Muß das Plasmid mechanisch (z. B. Ultraschallbehandlung) bzw. enzymatisch zerkleinert werden, um effektiv zu hybridisieren ?
- Muß mit Hilfe einer PCR eine Bakterien-spezifische Sequenz vervielfältigt und anschließend hybridisiert werden, um genug DNA für ein Sensorsignal zu erhalten ?

4.1. Aufreinigung und Isolierung

500 ml einer Bakterienkultur von *Escherichia coli*, Stamm DH5 α , (OD ~ 0.5) ergaben eine Ausbeute von 1.14 mg Plasmid pUC 19 (bestimmt über $A_{260 \text{ nm}}$). Abbildung 4.1. zeigt die gelchromatographische Trennung der aufgereinigten Probe.

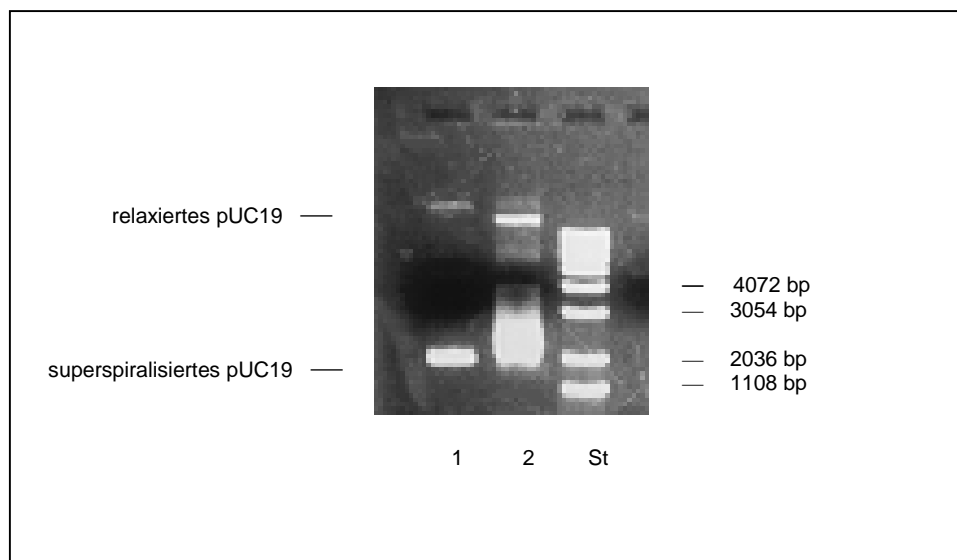


Abb. 4.1.: Aufgereinigtes Plasmid pUC 19 aus *E. coli* DH5 α nach 60 minütiger Auftrennung auf 1 %igem Agarosegel (80 V/h). Bande 1 zeigt die Verwendung von 0.326 μg DNA, während für Bande 2 1.6 μg eingesetzt wurden. Die dritte Bande entspricht dem Längenstandard (1 kb, Gibco BRL, Karlsruhe).

Die unterschiedlichen Banden repräsentieren den variierenden Spiralierungsgrad der Plasmide, der unterschiedliches Laufverhalten zur Folge hat. Relaxierte Plasmide wandern häufig langsamer durch die Agarosematrix als spiralisierte oder denaturierte Moleküle (Lottspeich *et al.*, 1998).

4.2. Hybridisierung von Plasmid pUC 19 an Gitterkoppler und BIAcore

Versuche, die den direkten Nachweis des gesamten Moleküls pUC 19 zum Ziel hatten, waren wenig erfolgreich : So konnte denaturiertes Plasmid in einer Konzentration von 50-165 nM (60 µl Injektionsvolumen) ($\approx 5.2 - 17 \mu\text{g}$) sowohl am Gitterkoppler wie auch am BIAcore kein Signal erzeugen. Bei den Messungen war der pUC 19 spezifische, komplementäre Gegenstrang (biotin forward pUC, s. Kap. II. 1.3.) auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Das Gesamtplasmid hatte eine Länge von 2686 bp, wobei der komplementäre Strang, ein 18-mer, spezifisch nur eine Region innerhalb der Plasmid-DNA binden konnte.

Ein zweiter Ansatz verwendete mittels 10-30 minütiger Ultraschallbehandlung verkleinerte Segmente des Plasmids. Eine Gelelektrophorese dokumentierte den schall-induzierten Zerfall der Nukleinsäure in kleine Bruchstücke (ca. 100-1000 bp). Jedoch konnte auch mit einer solchen, vor der Hybridisierung denaturierten Mischung kein signifikantes Signal erzeugt werden.

Im dritten Ansatz wurde das Plasmid (6 pmol) mit der 110fachen Konzentration an biotinylierter Sonde in 6xSSC ü.N. bei optimalen 53°C prehybridisiert. Durch die anschließende Verwendung eines Amicon *microcon-100* wurde überschüssiges biotinyliertes Oligonukleotid abgetrennt und die verbleibende Lösung über eine Streptavidin-beschichtete Sensoroberfläche geströmt. Auch hier war kein signifikantes Signal sichtbar.

Die letzte experimentelle Strategie verwendete in-Lösung Prehybridisierung von biotinylierter Sonde und Plasmid. Die Affinitätsreaktion zwischen der Avidin-Oberfläche und dem Biotinmarker sollte das gesamte Hybrid binden und ein entsprechendes Signal erzeugen. Das Postulat einer verknäulten Struktur der Nukleinsäure ($M_r \approx 810.000 \text{ g/mol}$) würde erklären, warum das Biotinmolekül (244 g/mol) sterisch gehindert war, um das gesamte Hybrid zu fixieren. Die tiefe Biotin-Bindungstasche des Proteins benötigt zusätzlich ein möglichst frei zugängliches Molekül (Wilchek *et al.*, 1990).

4.2.1. Schlußfolgerungen :

- Resümieren läßt sich, daß ein Ansatz, der den direkten Nachweis eines Plasmides verfolgt aus Gründen der Zugänglichkeit der spezifischen Sequenz und aufgrund des vorgegeben geringen Zeitrahmens für die Hybridisierung nicht möglich war.
- Die Charakterisierung von Bakterien auf Ebene der DNA ohne vorherige Amplifikation war daher nicht möglich.

4.3. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von *E. coli* DH5 α

Wie im vorigen Kapitel geschildert, war die Strategie des direkten Nachweises eines Plasmids mit Hilfe der optischen Detektoren wenig erfolgreich. Daher sollte versucht werden, eine spezifische Sequenz aus dem bakteriellen Genom zu vervielfältigen und die Produkte der PCR durch Hybridisierung nachzuweisen.

Zur Optimierung der Annealingtemperatur der Primer wurde die Temperatur über einen Bereich von 48-62 °C variiert. Das Agarosegel in Abbildung 4.2. zeigt die Abhängigkeit der Produktbildung von der Temperatur :

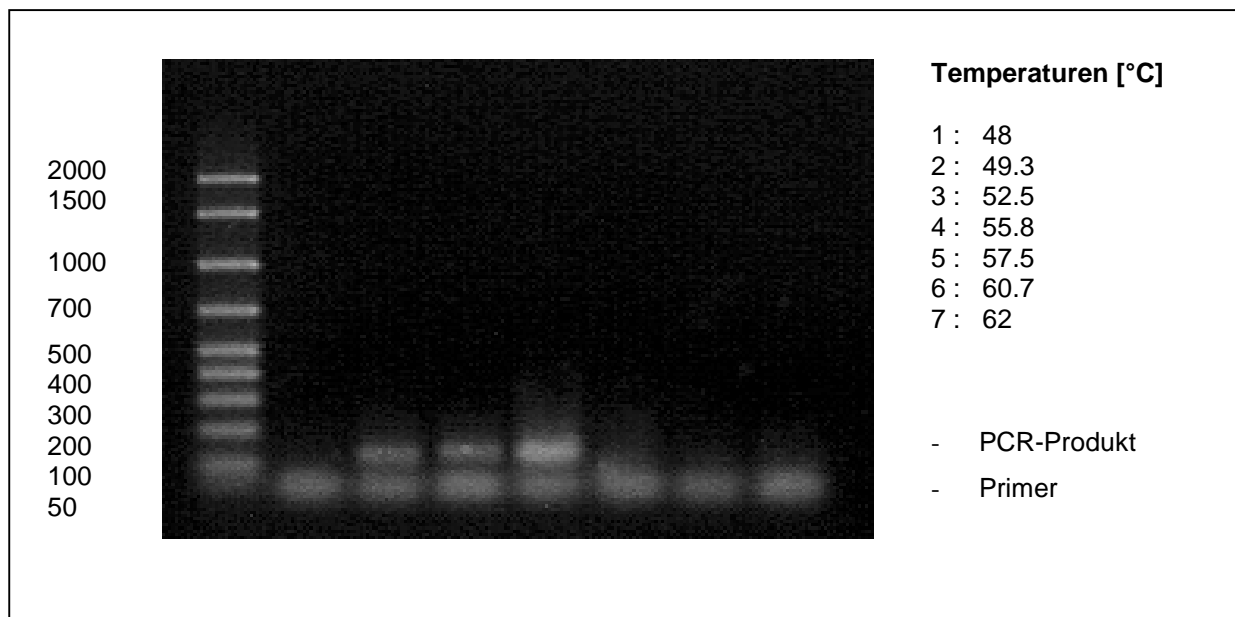


Abb. 4.2.: Variation der Annealingtemperatur für die Primeranlagerung. Die anderen Temperaturen waren 95°C (30 s) für die Denaturierung und 72°C (60 s) für die enzymatische DNA-Synthese (Elongation). (LS: Längenstandard 50-2000 bp).

Die Amplifikation der gesuchten Sequenz (125 bp lang) war bei ca. 56 °C besonders effektiv, so daß diese Temperatur für die weiteren Experimente gewählt wurde. Ab 58°C wurde bei den gewählten Randbedingungen und dem verwendeten Thermocycler eine Abnahme der Produktbildung festgestellt.

Mit den charakterisierten Randbedingungen wurden Bakterienzellen ohne weitere Aufreinigung der Plasmide in die PCR eingesetzt.

Dazu wurden *E. coli*-Proben aus der Hauptkultur mit optischen Dichten von $OD_{600nm} = 0.028$, 0.078, 0.230 und 0.626 angesetzt und die Produkte mit denen verglichen, die mit aufgereinigtem Plasmid (1 ng DNA) erhalten wurden. In die PCR wurden 10 μ l der jeweiligen Bakterienkultur eingesetzt und nach dem in Kap. II. 2.3.3. (Tab. 2.2.) abgebildeten Schema behandelt. Die Bakterien wurden Temperatur-induziert (95°C für 15 min) lysiert. Abbildung 4.3. verdeutlicht, daß selbst bei der am meisten verdünnten Probe ein Produkt der Länge von 125 bp sichtbar war.

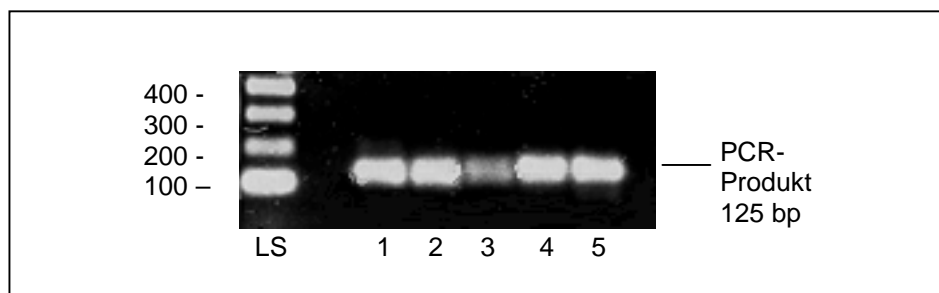


Abb. 4.3.: Ausschnitt einer Gelelektrophorese (1.5% Agarose in 1xTBE-Puffer) von PCR-Produkten, die durch den direkten Einsatz von *E. coli* DH5 α -Zellen entstanden sind. Die Banden entsprechen folgenden $OD_{600 nm}$ -Werten: Probe 1: pUC19 (1 ng DNA), Probe 2: = 0.028, Probe 3: 0.078, Probe 4: 0.230, Probe 5: 0.626. Als Längenstandard (LS) wurde eine DNA-Leiter von 100-2072 bp (Gibco, Karlsruhe) verwendet.

Nach Birkenbeil (1983) entspricht eine optische Dichte von 0.028 einer ungefähren Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ /ml (Jedoch muß hier angemerkt werden, daß die Korrelation zwischen der Extinktion bei 600nm und der Keimzahl nur eine Abschätzung der Bakterienkonzentration ermöglicht. Genauere Bestimmungen sind durch die Anwendung von Zählkammern zu erreichen (Schlegel, 1981)).

Postuliert man einen Gehalt von 500 bis 700 Plasmide pUC19 pro Zelle, entspricht das einer Molekülanzahl von $2.5\text{--}3.5 \cdot 10^8$ pUC 19/PCR-Ansatz (entspricht ca. $4.15\text{--}5.8 \cdot 10^{-16}$ mol \cong 0.35 – 0.5 ng / Ansatz).

4.4. Nachweis von PCR-Produkten mit Hilfe optischer Detektoren

Für die Untersuchungen am BIAcore-Gerät wurde ein mit Streptavidin beschichteter Sensorchip SA5 mit biotinylierten Sonden-Oligonukleotiden inkubiert (Anlagerung: ~ 0.83 ng/mm²), die spezifisch für das PCR-Produkt waren (Biotin forward pUC, s. Kap. II. 1.3). Um

eine Hybridisierung zu ermöglichen, wurde das doppelsträngige Produkt zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend über die Sensoroberfläche gegeben. Als Alternative wurde eine spezielle Variante der Amplifikationsreaktion, die sog. *asymmetrische PCR* (s. Kapitel II. 2.3.4.) durchgeführt, um als Produkt ein einzelsträngiges Segment zu erhalten, das leichter hybridisieren sollte.

Abbildung 4.4. zeigt eine Messung, die für die klassische, symmetrische PCR deutlich macht, daß trotz Bildung von Einzelsträngen durch die Hitzedenaturierung keine Signalzunahme durch Oberflächenhybridisierung stattfand :

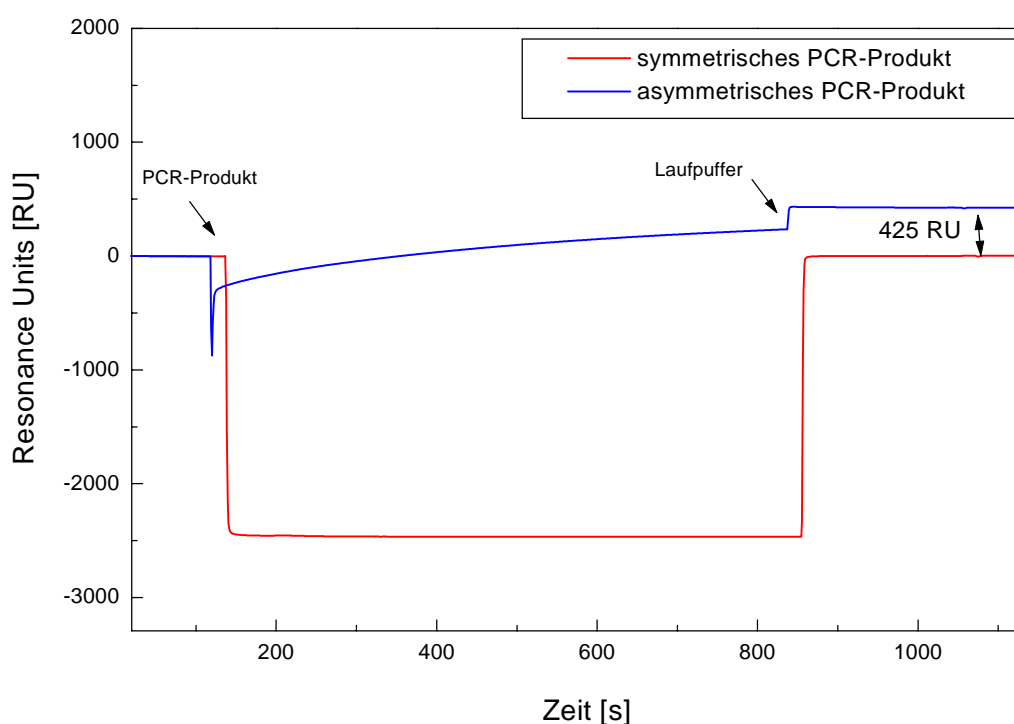


Abb. 4.4.: Vergleichende Hybridisierung von symmetrischem und asymmetrischem PCR-Produkt (aus pUC 19). Die Proben überströmten einen mit Streptavidin und komplementärem Oligonukleotid (18-mer, biotin-forward-PUC, ~ 830 RU) vorbeschichteten Sensorchip SA5. Der Laufpuffer (2xSSC) wies eine andere Salzkonzentration als der Hybridisierungspuffer (0.6xSSC) auf, so daß es zu Beginn und zum Ende der Inkubationsphase zu einem Puffersprung kam.

Deutlich wurde für das symmetrische, doppelsträngige PCR-Produkt, daß die Zeit von der Denaturierung des Amplikons bis zur Erreichung der Sensoroberfläche (ca. 5-10 min) genügte, damit die Stränge wieder rehybridisierten und damit unzugänglich für die Oberflächenreaktion wurden.

Das Produkt der asymmetrischen PCR bestand dagegen weitgehend aus einzelsträngiger DNA, die leichter hybridisieren konnte und somit eine Signal von 425 RU erzeugte ($\cong 0.425$

ng/mm², ca. 10 fmol gebundenes einzelsträngiges Amplikon). Aufgrund des Signals für die Anlagerung der biotinylierten Sonden und ihrer molaren Masse ließ sich das molare Verhältnis von Sonde zu Amplikon berechnen: In diesem Fall waren 7% der zur Verfügung stehenden Sonden-Moleküle hybridisiert.

Mit Hilfe des optischen Detektors war es auch möglich, den Zusammenhang zwischen der Anzahl der PCR-Zyklen und dem resultierenden Sensorsignal zu ermitteln. Abbildung 4.5. zeigt die Ergebnisse für die Hybridisierung von Proben nach 15, 25, 30, 35 und 45 PCR-Zyklen.

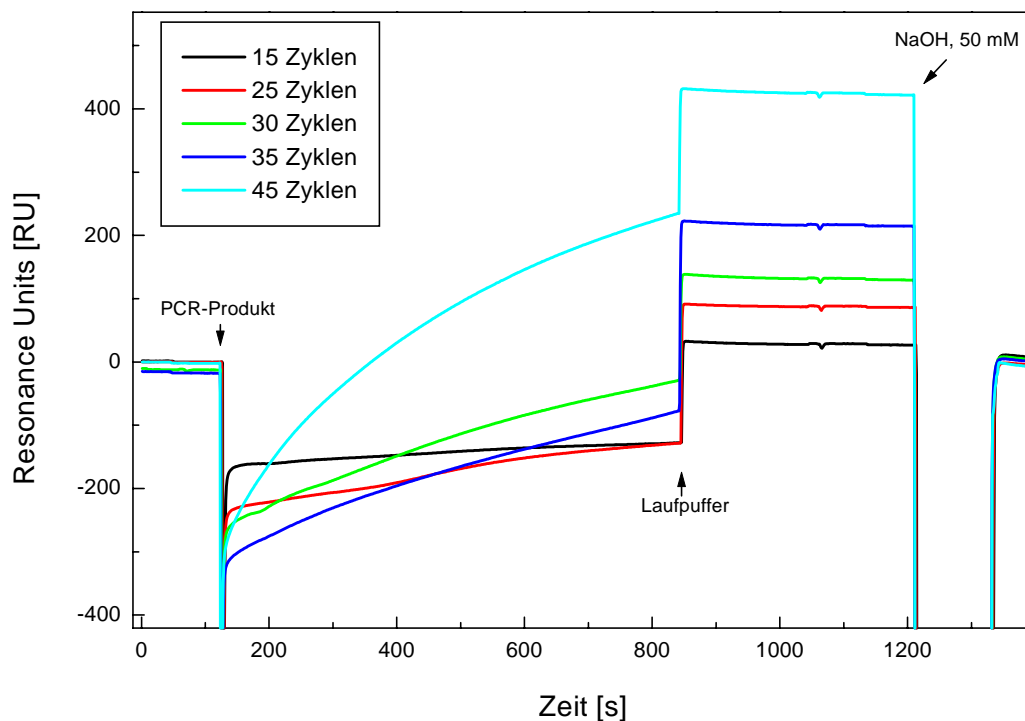


Abb. 4.5.: Abhängigkeit des Sensorsignals von der Anzahl der asymmetrischen PCR-Zyklen. Die Hybridisierung erfolgte in 0.6xSSC, während als Laufpuffer 2xSSC verwendet wurde. Die biotinylierte Sonde war mit ca. 830 ng/mm² vorbeschichtet. Die asymmetrische PCR verlief unter Anwendung von 10 µl symmetrischen PCR-Produkts (aus 25 Zyklen) und 100 pmol Reverse-Primer. Zur Regenerierung der Sensoroberfläche wurde 50 mM NaOH eingesetzt.

Die asymmetrische PCR ist charakterisiert durch die lineare Zunahme ihrer Syntheseprodukte, im Gegensatz zum exponentiellen Produktanstieg bei symmetrischer PCR. Abbildung 4.6. zeigt die Korrelation zwischen Sensorsignal und Zyklenzahl in einer zusammenfassenden Darstellung. Deutlich wurde, daß unter 20 asymmetrischen PCR-Zyklen kein signifikantes

Signal meßbar war. 25 Zyklen waren jedoch ausreichend, um den Fortschritt der Amplifikationsreaktion in einem linearen Anstieg zu dokumentieren:

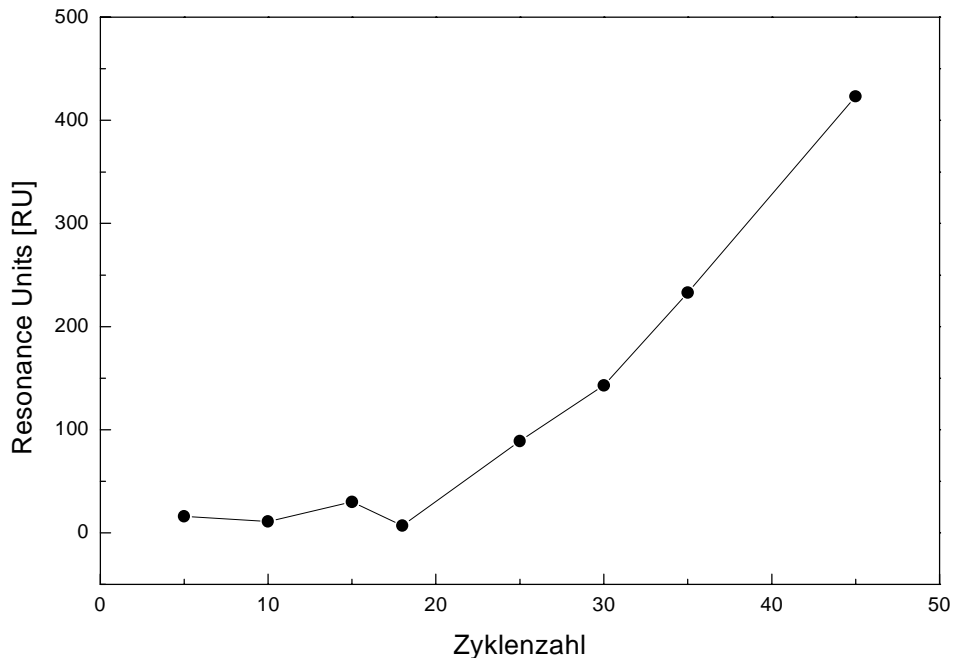


Abb. 4.6.: Korrelation zwischen Sensorsignal am BIAcore und Zykluszahl der asymmetrischen PCR.

Die Hybridisierung der Probe nach 25 Zyklen hatte zur Folge, daß lediglich ca. 1.5 % aller Sonden-Moleküle, die auf der Oberfläche zur Verfügung standen, reagiert hatten. Wie oben berechnet, waren bei 45 Zyklen nur ca. 7% hybridisiert, so daß die Sättigungsgrenze der Sensoroberfläche bei den gewählten Bedingungen nicht erreicht war.

4.5. Schlußfolgerungen :

- Die PCR konnte für die gewählte Sequenz auf 56°C optimiert werden. Produkte waren über eine breite Temperaturspanne sichtbar.
- Das Bakterium *E. coli* DH5 α konnte direkt und ohne weitere Aufreinigung in der PCR eingesetzt werden. Die thermische Lyse reichte aus, um die Plasmid-DNA für die Amplifikationsreaktion zugänglich zu machen. Störeinflüsse durch Zellkompartimente waren nicht nachweisbar.
- Doppelsträngige PCR-Produkte konnten am BIAcore-Gerät auch nach vorhergehender Denaturierung nicht hybridisiert werden. Einzelsträngige Moleküle einer *asymmetrischen* Reaktion waren dagegen nachweisbar.
- Mit einzelsträngigen Amplikons konnte eine Abhängigkeit zwischen PCR-Zykluszahl und Sensorsignal gezeigt werden.

5. Applikation II: RNA-Analytik

Für die Untersuchungen zum Nachweis von RNA mit Hilfe optischer Detektoren wurden zwei Anwendungsbeispiele gewählt:

Erstes Ziel war der spezifische Nachweis der 5.8S rRNA, die als ein integraler Bestandteil der Ribosomen in hoher Konzentration in der Zelle vorhanden ist. Daher konnte durch die Aufreinigung einer einfachen 1l-Schüttelkultur von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) genügend Material für Messungen erhalten werden. Ribosomale RNA und deren Gene wurden in der Vergangenheit häufiger genutzt, um z. B. Bakterienarten in Proben zu charakterisieren und zu diskriminieren (Grimont *et al.*, 1999 und Widmer *et al.*, 1998)

Im zweiten Anwendungsschwerpunkt der RNA-Analytik sollte messenger-RNA (mRNA) aus *Pichia Pastoris* isoliert und nachgewiesen werden. Ziel war die Verfolgung des mRNA-Verlaufes während einer Fermentation. Weiterhin sollte versucht werden, das gezielt exprimierte Protein Luziferase auf mRNA Ebene nachzuweisen. Jedoch war nicht bekannt, in welcher Menge die spezifische mRNA vorlag, so daß man auch mit äußerst geringen Konzentrationen von Kopienzahlen <10 pro Zelle rechnen mußte.

In beiden Schwerpunkten wurden gezielt Magnetpartikel als Hilfsmittel zur RNA-Aufreinigung eingesetzt. Dafür wurden zwei kovalente Kopplungsvarianten zur Bindung der Sonden an die Beads getestet. Einmal wurde das Protein Streptavidin chemisch verknüpft, so daß biotinylierte Oligonukleotide immobilisiert werden konnten. Das andere Mal wurde die DNA direkt über Crosslinker gebunden. Beide Magnetpartikel sollten in der Analytik vergleichend zum Einsatz kommen.

5.1. Ribosomale RNA : Aufreinigung und Northern Blotting

Methoden der klassischen RNA- bzw. Genexpressionsanalytik fanden in den ersten Experimenten Anwendung. Die Fragestellungen und Ziele dieser Untersuchungen kann man folgendermaßen zusammenfassen :

- Welche Oligonukleotide („Sonden“) sind geeignet, um eine effektive Hybridisierung an die 5.8S rRNA zu ermöglichen ? Wichtigster Gesichtspunkt der Sondenwahl war die spätere Übertragbarkeit auf den Sensor. Die Hybridisierungstemperatur sollte in einem Bereich zwischen 20-37°C (potentieller Arbeitsbereich des BIAcore Gerätes) liegen.
- Wie sind die optimalen Hybridisierungsbedingungen für die Oligos ?
- Gibt es Probleme durch RNasen, ubiquitäre Enzyme, die den RNA-Abbau katalysieren ?

Zur Isolation und Aufreinigung der ribosomalen RNA wurde das *RNAeasy-Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet, das auf einer Aufreinigung über Anionenaustauschersäulen beruht (Vorschrift s. Kap. II. 2.4.2.3.). Resultat des Prozesses war eine Konzentration von 370 ng/μl Total-RNA. Quantifiziert wurde die Nukleinsäure dabei nach Kap. I. 4.4., die einen Zusammenhang zwischen Konzentration und UV-Absorption der gemessenen Lösung herstellt.

Anschließend wurde die Qualität der Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese getestet. Das Gel (s. Abb. 5.1.) zeigte klar diskriminierbare Banden für die unterschiedlichen rRNAs, ein Anzeichen, daß es keinen Abbau durch RNasen gab :

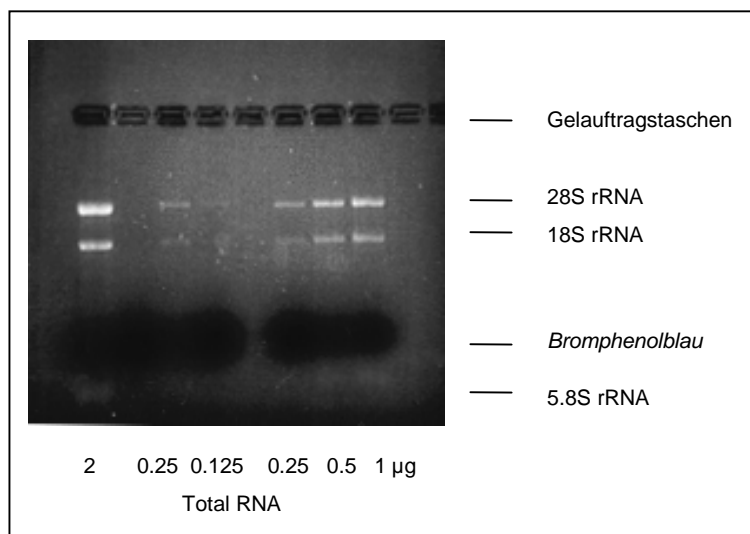


Abb. 5.1.: Gelelektrophorese (1.5 % Agarose in 1xFA-Puffer) der aufgereinigten Gesamt-RNA-Proben. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen an Nukleinsäure eingesetzt.

Die klar diskriminierbaren Banden zeigen 28S, 18S und 5.8S rRNA. Die RNA wurde aus der Gelmatrix auf eine feste Nylonmembran geblottet, damit die Nukleinsäure fixiert für Hybridisierungsexperimente zur Verfügung stand.

Northern-Blot-Untersuchungen sollten die Frage nach geeigneten Sonden für die Hybridisierung an die 5.8S rRNA klären. Dabei lag die radioaktiv markierte Sonde mit einer Konzentration von jeweils 5 nM (Hybridisierungsvolumen ~20 ml) im Überschuß vor.

Die drei Oligonukleotide RNA2, RNA3 und RNA4 (14-, 18- und ein 22-mer, Sequenzen s. Kap. II. 1.3) wurden enzymatisch mittels Polynukleotidkinase-Reaktion am 5'-Ende radioaktiv markiert (s. Kap. II. 2.4.4.3.). Überschüssiges radioaktives γ - ^{32}P -ATP ist mit Hilfe einer säulenchromatographischen Aufreinigung über NAP-5 (Sephadex G25-Material) gelfiltrativ entfernt worden :

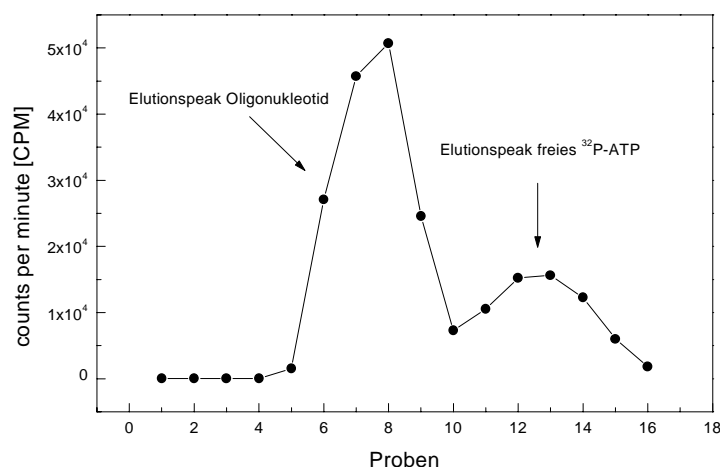


Abb. 5.2.: Elutionsverlauf der NAP 5-Aufreinigung des radioaktiv markierten Oligonukleotids. Der erste Peak (Proben 6-9, Gesamtvolumen : 600 μ l) entsprach dem Oligonukleotid, während ab Probe 10 die freien Nukleotide eluiert wurden.

Erste Messungen sollten die Anwesenheit von 5.8S rRNA nachweisen und die Zugänglichkeit der gewählten Hybridisierungssequenz der Nukleinsäure überprüfen. Nach Gleichung (1) erhielt man für verschiedene Salzkonzentrationen und Temperaturen die in Tabelle 5.1. gezeigten Daten :

Oligo	Länge [bp]	Konzentration NaCl [M]	T _m [°C]	T _{hyb} [°C]
RNA2	14	0.9	40	35
RNA3	18	0.9	54	49
RNA3	18	0.09	38	33
RNA4	22	0.9	70	65

Tab. 5.1.: Berechneter Zusammenhang zwischen Hybridisierungstemperatur und Salzkonzentration (s. Kapitel I. 4.2.).

Die Hybridisierungstemperatur wurde nach Birren *et al.* (1997) auf 5°C unter dem berechneten Schmelzpunkt gewählt. Für radioaktiv markiertes RNA3 und RNA4 erhielt man bei Hybridisierung ü. N. im Rollinkubator die in Abbildung 5.3. resultierenden Banden durch die spezifische Hybridisierung an 5.8S rRNA:

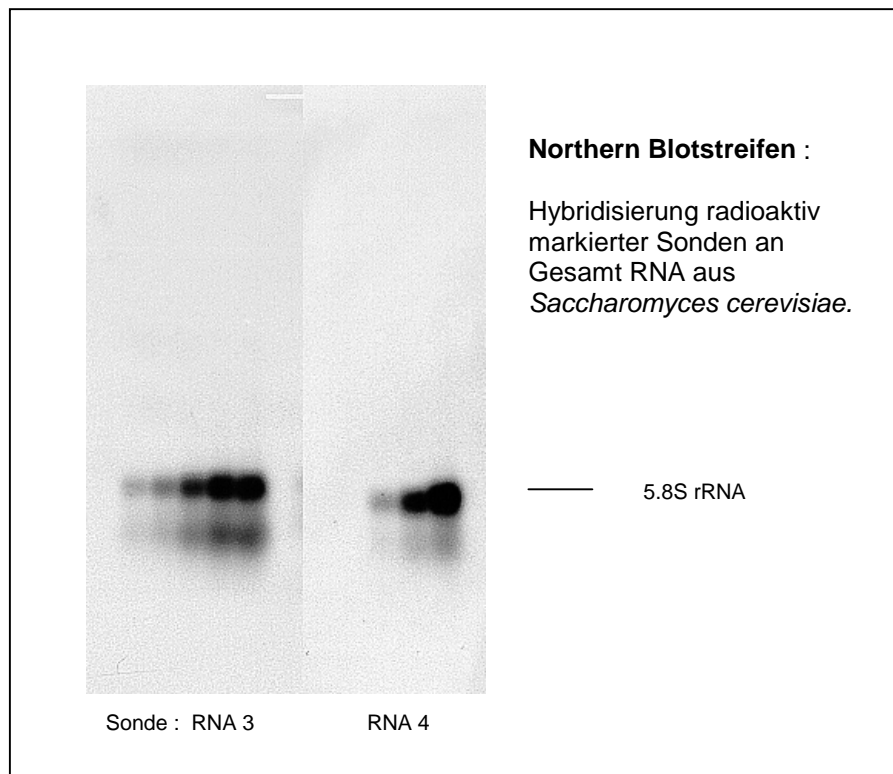


Abb. 5.3.: Northern-Blot eines Total-RNA-Agarose Gels. Nach 4-stündiger Prehybridisierung (Absättigung der Oberfläche mit Polymere, BSA und Herings-Sperma-DNA) bei 49 °C wurden die Membranen ü. N. bei den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen mit 100 pmol radioaktiv markierter Sonde inkubiert. Die linke Membran zeigt das Resultat des Oligos RNA-3 nach zweimaligem Waschen in 6xSSC + 0.1 % SDS (49°C). Rechts die Membran des Oligos RNA-4 nach Waschen bei 65°C. Die Konzentrationen der Proben waren 0.165, 0.31, 0.62, 1.25 und 2.5 µg Total-RNA. Die Blots wurden mit Hilfe des Phosphorimagers ausgewertet.

Da für eine spätere Anwendung auf dem Sensor eine niedrigere Hybridisierungstemperatur wünschenswert war, wurden die Salzkonzentrationen weiter erniedrigt, um die Bedingungen stringent zu halten. Auch wurde das 14-mer RNA 2 eingesetzt, da das Oligonukleotid aufgrund der Länge eine geringere Schmelztemperatur besaß. Die in Abbildung 5.4. dargestellten Blotstreifen sollten Aufschluß über Hybridisierungstemperaturen zwischen 28 und 33°C geben.

Eine Prehybridisierung (s. Kap. II. 2.4.4.4.) mit 100xDenhardts`Reagenz, 10 % SDS und Herings-Sperma-DNA (2.5 mg/Hybridisierungsvolumen von 20 ml) verhinderte eine unspezifische Anlagerung der radioaktiven Sonde durch Absättigung der Membranoberfläche.

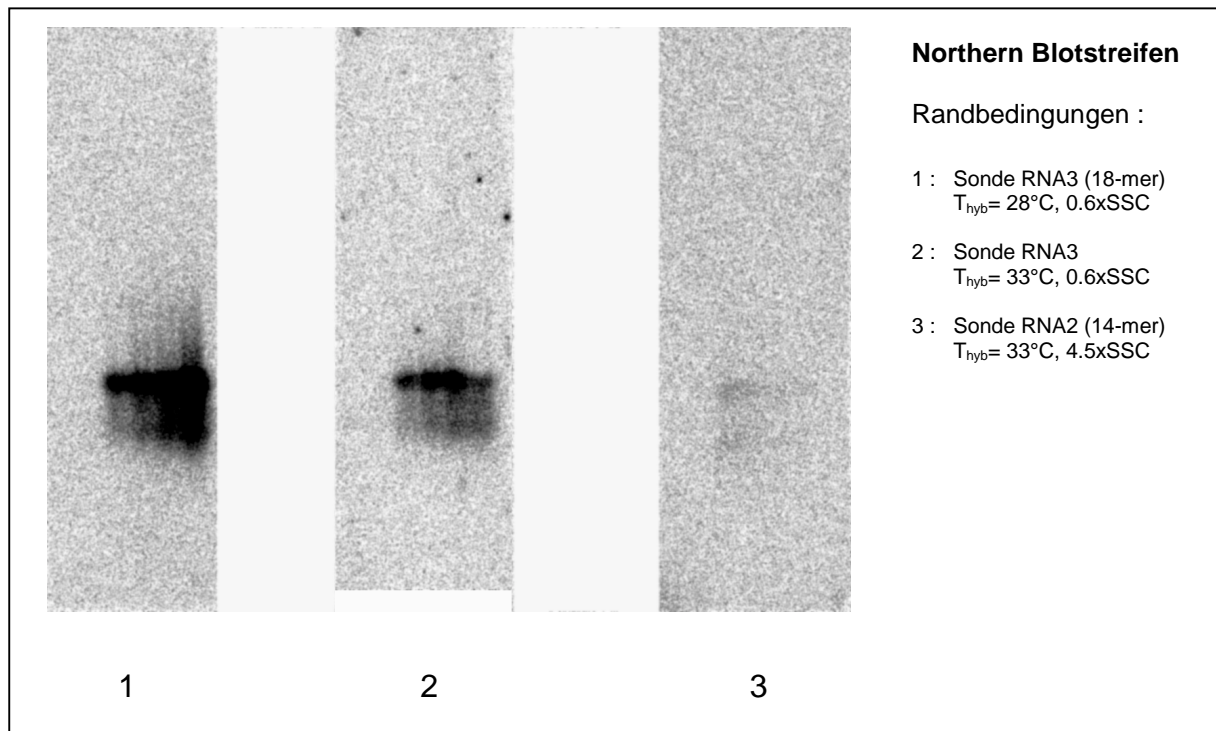


Abb. 5.4.: Northern-Blot-Streifen eines Total-RNA-Agarose Gels. Die Prehybridisierung der Streifen verlief in den jeweiligen Hybridisierungspuffern. Die anschließende Hybridisierungsreaktion, für die 100 pmol radioaktiv markierter Sonde zugesetzt wurde, erfolgte ü. N. bei den angegebenen Bedingungen.

Deutlich wurde, daß die Sonde RNA2 nach einem 15 minütigen Waschschrift fast komplett gewegewaschen war. Das Oligonukleotid erwies sich für die gewählten Randbedingungen als ungeeignet zum weiteren Einsatz. Dagegen hybridisierte radioaktives RNA3 in diskriminierbaren Banden bei 28 °C, so daß die evaluierten Hybridisierungsbedingungen für weitere Untersuchungen am optischen Detektor und für die Aufreinigungsexperimente mit Magnetpartikeln übertragen werden konnten.

5.1.1. Schlußfolgerungen :

- Die Sonde RNA3 zeigte auf dem Northern-Blot im Bereich von 28-33°C gute Hybridisierungseigenschaften an die 5.8S rRNA. Stringente Bedingungen für die Hybridisierung wurden für 0.6xSSC erreicht.
- Unspezifische Bindungen wurden auf dem Blot durch die Verwendung von 100xDenhardts`Reagenz, 10% SDS und Hering-Sperma-DNA (10 µg/µl) unterdrückt.
- Kein nachweisbarer Abbau der Nukleinsäure durch RNasen, trotz fehlender RNasen-Hemmer wie DEPC oder RNasin.

5.2. Einsatz von Magnetpartikeln in der rRNA-Aufreinigung

Magnetpartikel wurden in der Vergangenheit häufig zur Isolation und Aufkonzentrierung eukaryontischer mRNA benutzt (s. Kap. II. 2.4.5.1.). In dieser Arbeit wurde neben der herkömmlichen Aufreinigung der mRNA über das PolyA-Ende versucht, 5.8S rRNA durch Magnetbeads zu isolieren. Die Sonden sollten dazu durch zwei unterschiedliche Varianten an die Beads fixiert werden :

1. Kovalente Kopplung von Streptavidin über Glutardialdehyd und Nutzung biotinylierter Sonden.
2. Chemische Kopplung phosphorylierter Oligonukleotide mit Hilfe des Crosslinkers EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidHCl) (Ghosh *et al.*, 1987 und Kröger, 1998).

Ziel war es, die effektivere Methode der Bindung zu evaluieren und diese für die Aufreinigung der RNA einzusetzen.

5.2.1. Kopplung über das Carbodiimid EDC

Um den Zeitbedarf der direkten Kopplung unter Bildung einer Phosphoamidbindung zu optimieren, wurde das Oligonukleotid (RNA-4, 22-mer) für 1, 16, 20 und 40 h mit dem Crosslinker EDC und den Magnetpartikeln inkubiert (Vorschrift s. Kap. II. 2.4.5.2.).

Das Oligonukleotid wurde *vor der eigentlichen Kopplung* an die Beads durch eine Polynukleotidkinase und γ -³²P-ATP am 5'-Ende enzymatisch radioaktiv markiert. Eben dieser Phosphatrest wurde dann für die kovalente Bindung ausgenutzt. Abbildung 5.5. zeigt den Einfluß der Inkubationszeit von 25 pmol RNA4 pro mg Magnetbeads. Nach Kap. II. 2.4.5.3. (Gleichung (10)) wurde die prozentual gebundene Radioaktivität bestimmt, die das Verhältnis zur insgesamt eingesetzten Radioaktivität (Gleichung (9)) charakterisiert:

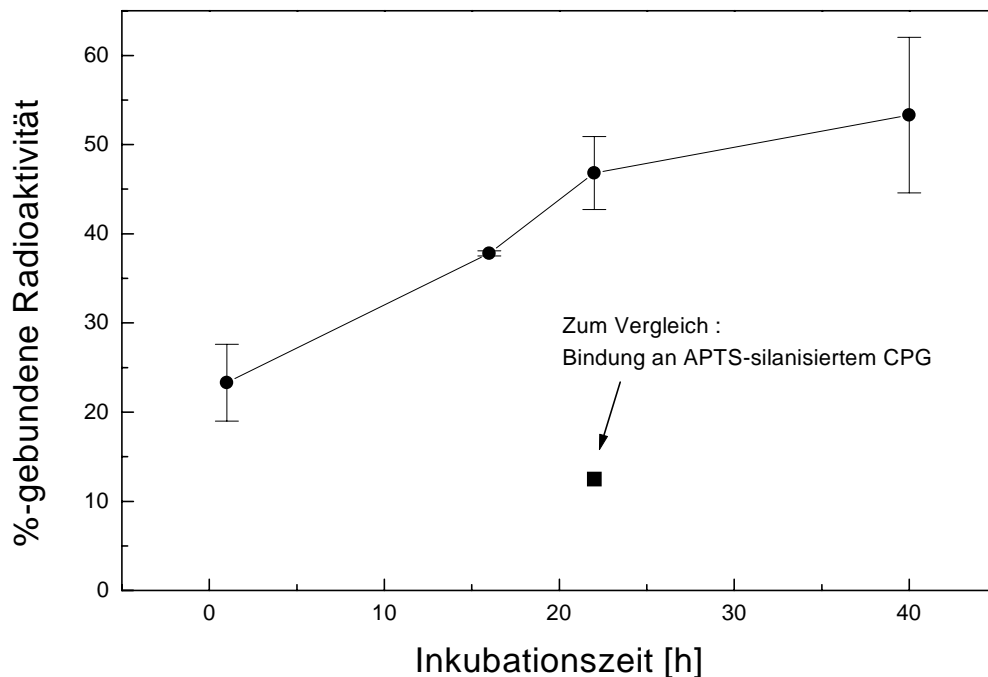


Abb. 5.5.: Zeitabhängigkeit der Bindung von radioaktiv markiertem Oligonukleotid RNA4 an 1 mg Magnetbeads (NH_2 -Gruppen auf der Oberfläche, Paesel, Frankfurt/M.) ermittelt in Doppelbestimmung. Angezeigt ist ein Vergleich der Bindungs-effektivitäten an CPG und Magnetpartikel (jeweils 1 mg). Deutlich zu erkennen war die um 75 % reduzierte Oberflächenbeladung im Vergleich zu den Magnetbeads.

Die Bindungseffektivität wurde getestet, indem die Waschpuffer (2xSSC) nach jedem Waschschriff gesammelt und am Szintillationszähler vermessen wurden. Abschließend wurde die an den Magnetbeads verbleibende Radioaktivität zur Quantifizierung des gebundenen Oligonukleotids bestimmt. Abbildung 5.6. zeigt beispielhaft die prozentuale Verteilung der Radioaktivität über die Proben. Diese wurden nach jedem Waschgang vereinigt vermessen, d.h. es wurde immer solange mit 2xSSC (2-3 x) bzw. NaOH (1-2 x) gewaschen, bis nur noch geringe Mengen an Radioaktivität nachweisbar waren.

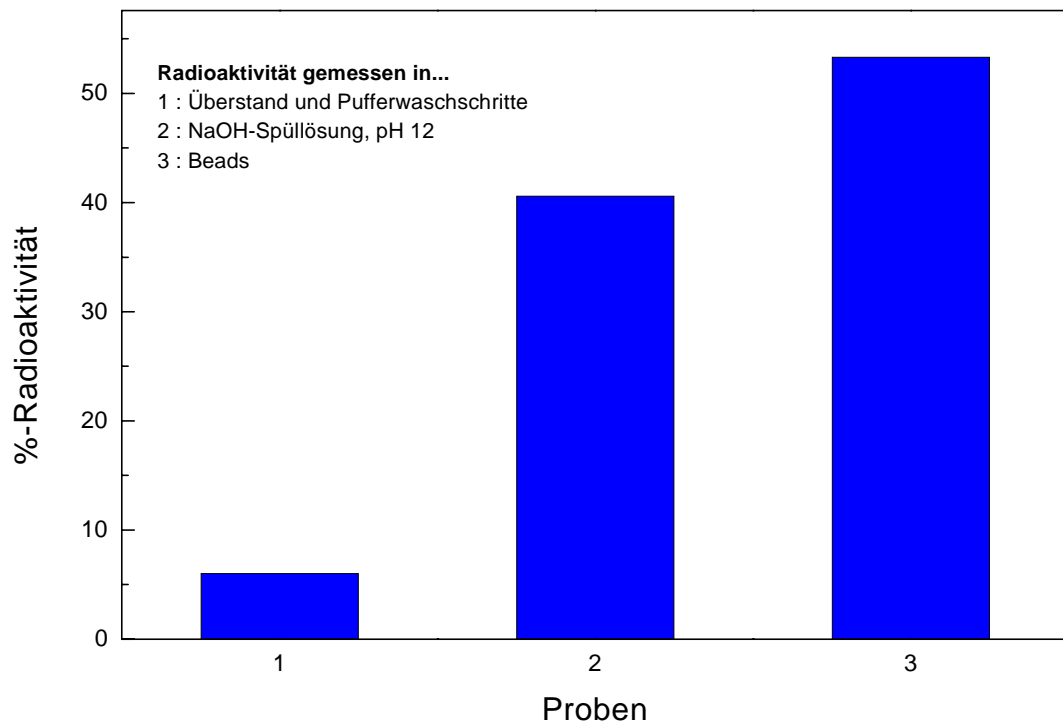


Abb. 5.6.: Gemessene Radioaktivität nach jedem Waschschrift. Die rechte Säule zeigt die verbleibende Radioaktivität an den Magnetbeads. Das Beispiel wurde für die Kopplungdauer von markiertem Oligo an Amino-Magnetbeads von 40 h gemessen. Die Angabe %-Radioaktivität bezieht sich immer auf das jeweilige Verhältnis zur Gesamtradioaktivität.

Durch die Zunahme der Inkubationszeiten für die Reaktion stieg die Bindung von radioaktiv markiertem Oligo RNA-4. Tabelle 5.2. zeigt jedoch, daß eine Verdopplung der Reaktionszeit von ca. 20 auf 40 h keine weitere Zunahme der Kopplungseffektivität lieferte. Eine Inkubation ü. N. war ausreichend, um eine Effektivität von ca. 50 % zu erhalten. Zum Vergleich zu den erhaltenen Daten haben Lund *et al.* (1988) unter Verwendung der analogen Kopplungsmethode, jedoch bei Einsatz von 600 pmol Oligo eine Beladungsdichte von 18-64 pmol/mg gefunden.

Inkubationszeit [h]	<u>Anteil des gebundenen Oligonukleotids</u>	
	[%]	[pmol/mg beads]
1	23.2 (± 4.3) %	5.8 (± 0.9)
16	37.2 (± 0.3) %	9.3 (± 0.1)
22	46.8 (± 4.1) %	11.7 (± 1.0)
40	50.5 (± 8.7) %	12.6 (± 2.1)

Tab. 5.2.: Abhängigkeit der Bindung von radioaktiv markiertem Oligonukleotid an 1 mg Magnetbeads von der Inkubationszeit der Kopplungsreaktion.

Parallel zu den Experimenten mit Magnetbeads wurden Glaspartikel (CPG, *controlled pore glass*) eingesetzt, um mögliche Alternativen zu evaluieren. Die Kopplungsbedingungen der Oligonukleotide waren jeweils identisch; CPG (\varnothing ~70-150 μm) wurde vor der Verwendung mit APTS silanisiert, um reaktionsfähige Aminogruppen zu erhalten. Der Vergleich der Partikeltypen, der in Abbildung 5.5. gezeigt ist, macht deutlich, daß die Bindungskapazität an CPG äußerst gering war. Nur 12.5 % der insgesamt eingesetzten Radioaktivität verblieben nach 22 h Kopplungsdauer gebunden an den Partikeln (Zum Vergleich : 46.8 % an Magnetbeads).

5.2.2. Vergleich der Kopplungsmethoden für Oligonukleotide an Magnetpartikel

Eine Einschätzung der Qualität der beiden Bindungsvarianten für Oligonukleotide, Avidin-Biotin vermittelt oder die direkte Bindung über EDC, war über Hybridisierungsexperimente möglich. Dabei wurde das 18-mer RNA3 an 1 mg Beads gekoppelt, wobei einmal Avidin-beschichtete Partikel und biotinyliertes RNA3, sowie über EDC direktgekoppeltes RNA3 zur Untersuchung stand. Nach einer 1.5 -ständigen Prehybridisierungsphase (s. Kap. II. 2.4.5.3.) wurden die Partikel mit der radioaktiv markierten Sonde compRNA3 (18-mer), die komplementär zum oberflächen-gebundenen Sonde war, für 3 h bei 28°C inkubiert. Nach Waschschritten mit 2xSSC wurde die verbleibende Radioaktivität an den Beads vermessen. Abbildung 5.7. macht deutlich, daß bei Avidin-Biotin-vermittelter Kopplung über 25 % der eingesetzten radioaktiven Proben hybridisieren konnten, jedoch nur ca. 9% an direktgekoppelten Oligonukleotiden.

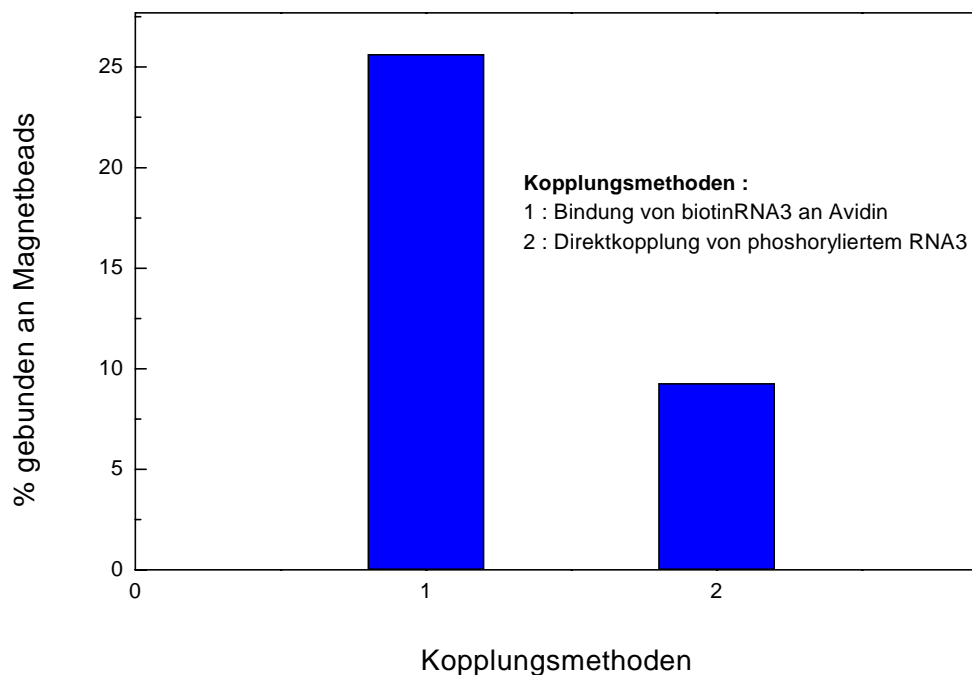


Abb. 5.7.: Vergleich der Hybridisierungseffektivitäten an verschieden modifizierten Magnetbeads. 1 mg Partikel wurden nach einer Prehybridisierung mit 25 pmol radioaktivem compRNA3 in 2xSSC hybridisiert.

5.2.3. Hybridisierungsreaktionen an Magnetpartikeln

An Avidin-Biotin-verbrückte Oligonukleotide verlief die Hybridisierung effektiver als an „direktgekoppelten“ Oligonukleotiden (s. Kap. III. 5.2.2.). Daher wurden alle weiteren Untersuchungen zur Hybridisierung an Avidin-beschichteten Beads durchgeführt.

Die Fragestellungen zu den Hybridisierungs-Experimenten kann man wie folgt zusammenfassen :

- Welche Inkubationszeit war für eine Hybridisierung bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands notwendig ?
- Welche Waschbedingungen mußte man anwenden, um unspezifische Bindungen an den Beads zu unterdrücken ?

Abschließend sollte mit den erprobten Sonden-Oligonukleotiden die 5.8S rRNA aus dem Total-RNA-Lysat aufgereinigt werden.

Die Optimierung der Waschschrte der Beads nach erfolgter Hybridisierung waren von entscheidender Bedeutung, um unspezifisch gebundene Proben zu entfernen. Abbildung 5.8. zeigt beispielhaft die Wirkung von drei Spülungen mit 2xSSC :

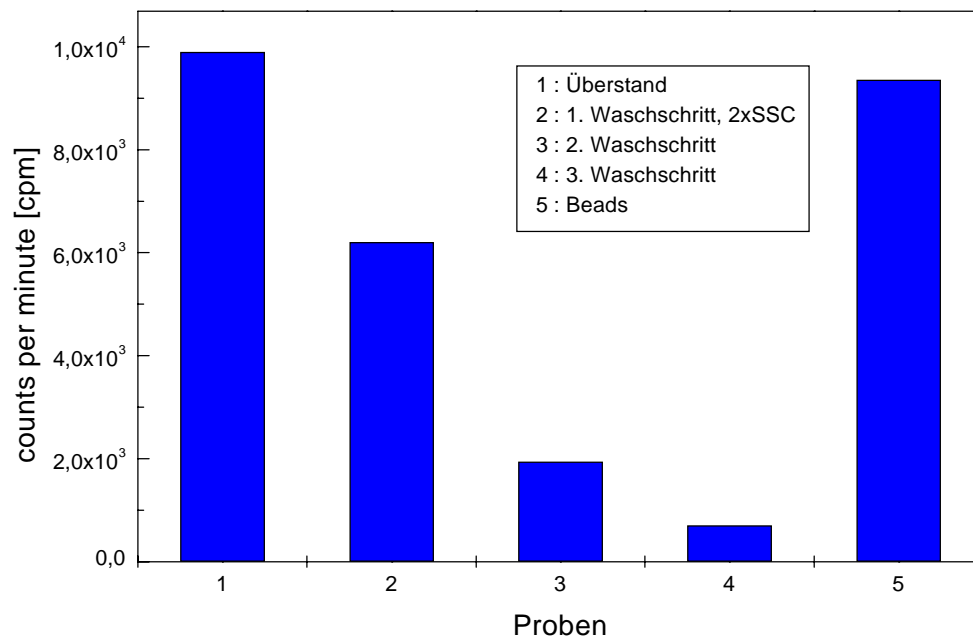


Abb. 5.8.: Exemplarische Darstellung zur Effektivität der Waschschrte nach 3 h Hybridisierung von 0.5 pmol radioaktivem compRNA-3 an 0.15 mg Magnetbeads. Die Messung zeigt eine verbleibende Bindung von 33 % ($\cong 0.17$ pmol).

Um die Bindungskapazität der Magnetbeads für hybridisierende Oligonukleotide zu bestimmen, war die Evaluierung des *Gleichgewichtszustandes der Hybridisierung* von Interesse. Dazu wurden je 0.15 mg Biotin-RNA4-Magnetbeads mit steigenden Konzentrationen an radioaktiv markiertem, komplementärem Oligonukleotid inkubiert (Abbildung 5.9). Das Experiment verlief anhand der Vorschrift in Kap. II. 2.4.5.3. :

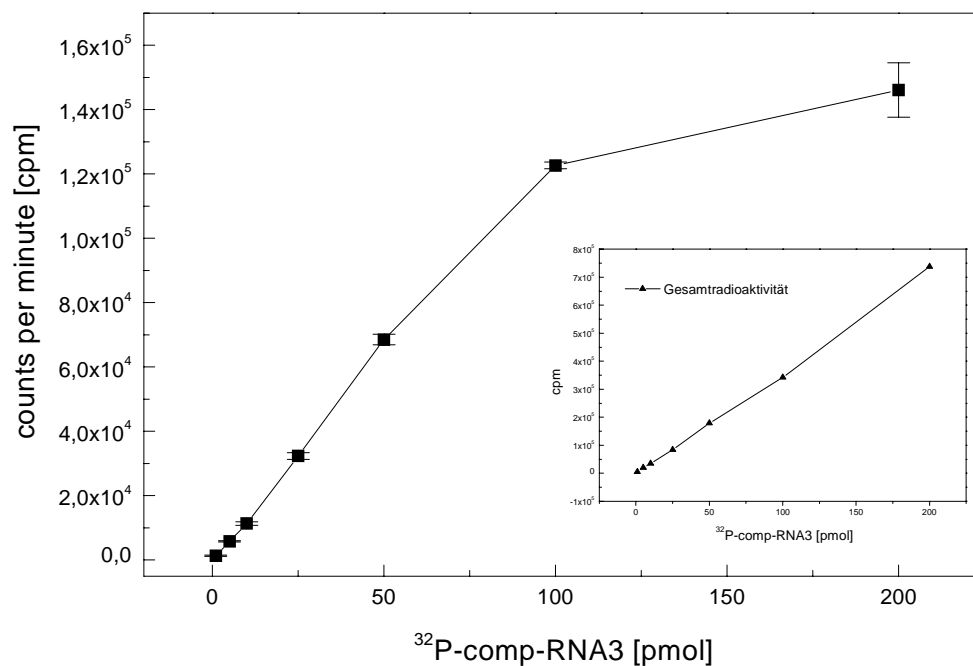


Abb. 5.9.: Hybridisierung eines komplementären, radioaktiven 18-mers (compRNA3) an 0.15 mg BiotinRNA4-Magnetbeads. Die prehybridisierten Beads reagierten mit dem Oligo für 3 h bei RT in 2xSSC-Puffer. Die eingefügte Graphik zeigt den linearen Verlauf der Gesamtradioaktivität (zusammengesetzt aus Überstand, Waschpuffer und Beads), auf deren Basis die prozentuale Berechnung der Radioaktivitätsmenge an den Beads möglich war.

Die Experimente mit den radioaktiven Proben ergaben für 0.15 mg Magnetbeads ein Hybridisierungsgleichgewicht ab 100-200 nmol compRNA3.

Stellt man nun die prozentual verbleibende Radioaktivität an den Beads in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetzter Probe dar, erhält man das folgende Ergebnis :

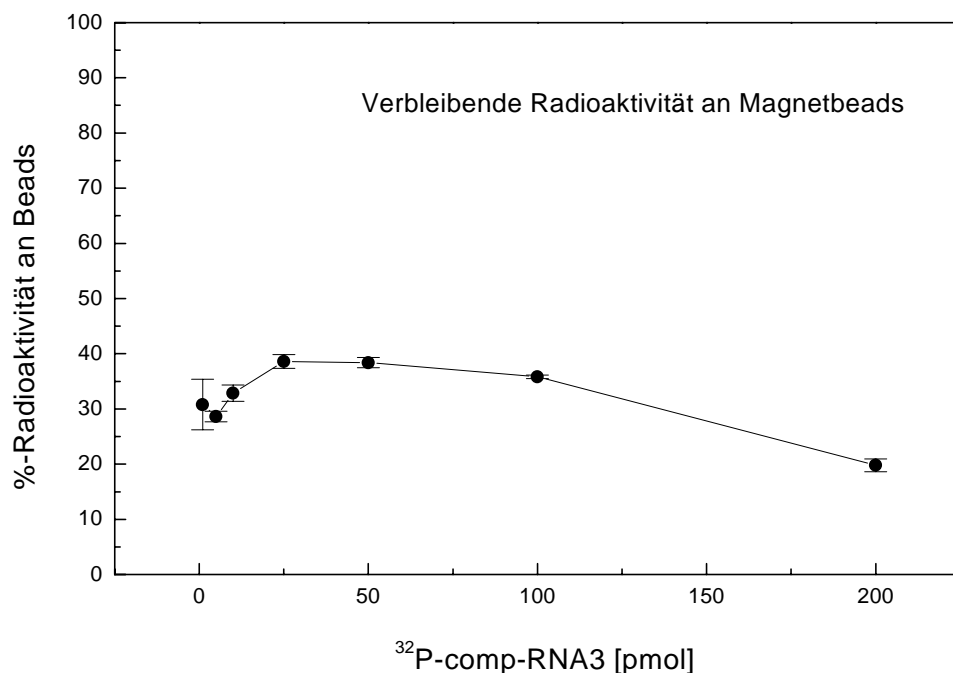


Abb. 5.10.: Verbleibende Radioaktivität an den Beads in Abhängigkeit von der Probenkonzentration: Steigende Konzentrationen des radioaktiven Komplementärstranges comp-RNA3 wurden mit je 0.15 mg Magnetbeads für 3 h hybridisiert und die verbleibende Radioaktivität vermessen. Die prozentual verbleibende Radioaktivität berechnet sich nach Gleichung (10).

Trotz Zunahme der Konzentration der radioaktiven Probe blieb die Radioaktivität an den Beads annähernd konstant. Eine Erklärung bietet die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, die als Verhältnis von freien zu ungebundenen Komplexen definiert wird. Nach Gleichung (2) berechnet sich die *Halbwertszeit der Hybridisierung* auf ca. 84 s, so daß man aufgrund der langen Inkubationszeit von 3 h davon ausgehen konnte, daß sich Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht befanden. Daher führte eine Zunahme an radioaktiven Probenoligonukleotid nicht zu einer höheren prozentualen Bindung an die Sonde, sondern zeigte einen Verlauf, der um ca. 30 % variierte.

5.2.4. Hybridisierung von 5.8S rRNA an Magnetpartikel

Um die ribosomale RNA aufzureinigen, wurden Proben der Gesamt-RNA in verschiedenen Konzentrationen denaturiert und anschließend mit Magnetpartikeln inkubiert, die mit BiotinRNA3 vorbeschichtet waren. Als Hybridisierungszeiten wurden 1, 3 bis zu 16 h bei den optimierten Bedingungen (s. Kap. III. 5.2.3.) gewählt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Magnetbeads isoliert, mit 2xSSC gewaschen und anschließend auf 95°C erhitzt,

um die Bindung der Sonden mit der rRNA zu lösen. Der Auftrag unbehandelter Vergleichsprobe, des Überstands nach erfolgter Hybridisierung und von Proben der über Beads aufgereinigten rRNA auf ein Agarosegel machte deutlich, daß sich im Gegensatz zu den Erstgenannten *keine* 5.8S rRNA in den aufgereinigten Proben wiederfand.

Um die Nachweisgrenze der Detektion weiter nach unten zu verschieben, wurde die RNA über Northern-Blotting auf eine Nylonmembran übertragen und mit Hilfe einer radioaktiven Probe untersucht. Wiederum zeigten sich nur die Hybridisierungsmuster an den Banden der Vergleichsproben, während bei den über Magnetpartikeln aufgereinigten Proben keine Hybridisierung sichtbar war.

5.2.5. Schlußfolgerungen :

- Über Crosslinker wie EDC lassen sich phosphorylierte Oligonukleotide unter Ausbildung einer Phosphoramid-Bindung an die Aminogruppen der Magnetpartikel binden. Bereits nach 1 h Reaktionszeit waren ca. 25 % der koppelbaren Oligonukleotide gebunden.
- CPG (*controlled pore glass*) zeigte im Vergleich zu Magnetpartikeln eine kleinere Bindungseffektivität. Eine geringere Oberfläche und eine kleinere Anzahl an Aminofunktionen aufgrund der APTS-Silanisierung könnten für das Resultat verantwortlich sein.
- Die Kopplung von Oligonukleotiden über Avidin-Biotin-Verbrückung war die effektivste der verglichenen Varianten, da im Hybridisierungsassay mehr Probenoligo binden konnte.
- Der radioaktive Assay ermöglichte eine Verfolgung der Wascheffektivität und den Einfluß verschiedener pH-Werte auf die beschichteten Partikel. Eine dreimalige Spülung mit 2xSSC für wenige Minuten war in diesem Fall sehr wirksam, um unspezifische Bindungen zu lösen.
- 5.8S rRNA ließ sich durch Magnetpartikel nicht aufreinigen. Die Ursache war vermutlich eine schnelle und weitgehende Rückfaltung in die Sekundärstruktur des Moleküls.

5.3. Genexpressionsanalytik mit optischen Biosensoren

Genexpressionsanalytik in der Bioprozeßkontrolle bedeutet bisher hauptsächlich die Anwendung klassischer Analysemethoden wie Northern-Blot und radioaktive Assays (s. Kap. II. 2.4.4.). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich optische Detektoren eignen, um den Expressionsstatus von Zellen während der Kultivierung zu evaluieren. Dazu wurde eine Kultivierung der Hefezelle *Pichia Pastoris* analytisch begleitet. Folgende Fragestellungen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen :

- Ist der Gehalt der gesamten mRNA über den Fermentationsverlauf bestimmbar ?
- Wieviel Total-RNA muß für ein signifikantes Signal eingesetzt werden ?
- Ist die Expression des Proteins Luciferase anhand der spezifischen mRNA zu verfolgen ?
- Sind Aufreinigungsschritte der mRNA vor der Applikation des optischen Detektors notwendig ?

Die *Pichia Pastoris*-Fermentation, die das Material für diese Untersuchungen liefern sollte, wurde von Frau Dipl.-Ing. Katja Eckert in der Gruppe von Dr. Joop van den Heuvel (BVT, GBF, Braunschweig) durchgeführt. Vergleichend wurden dort Northern-Blots zur klassischen Bestimmung des mRNA-Gehalts angewendet.

5.3.1. Nachweis von Gesamt-mRNA mit optischen Biosensoren

Bevor das BIAcore als optischer Detektor eingesetzt werden sollte, um während einer Fermentation den Verlauf der mRNA-Entwicklung während unterschiedlicher Zellstadien zu charakterisieren, waren einige grundlegende Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Sensorsignals von der Total-RNA-Menge notwendig.

Dazu wurde Total-RNA aus einer *Saccharomyces cerevisiae*-Kultivierung eingesetzt, die in verschiedenen Verdünnungen über die Sensoroberfläche geleitet wurde. Abbildung 5.11. zeigt den Sensorresponse einer mit Biotin-OligoT (24-mer) beschichteten Zelle und das Referenzsignal einer Streptavidinmatrix. Die Regenerierung der Oberfläche wurde mit 50 mM NaOH durchgeführt.

Deutlich beobachtbar war die schnelle Hybridisierung des PolyA⁺-Endes der mRNA-Moleküle an die Sensoroberfläche. Ab 0.4 µg war ein signifikantes (45 RU), bei 40 µg Einsatz ein maximales Sensorsignal (1085 RU) zu erkennen:

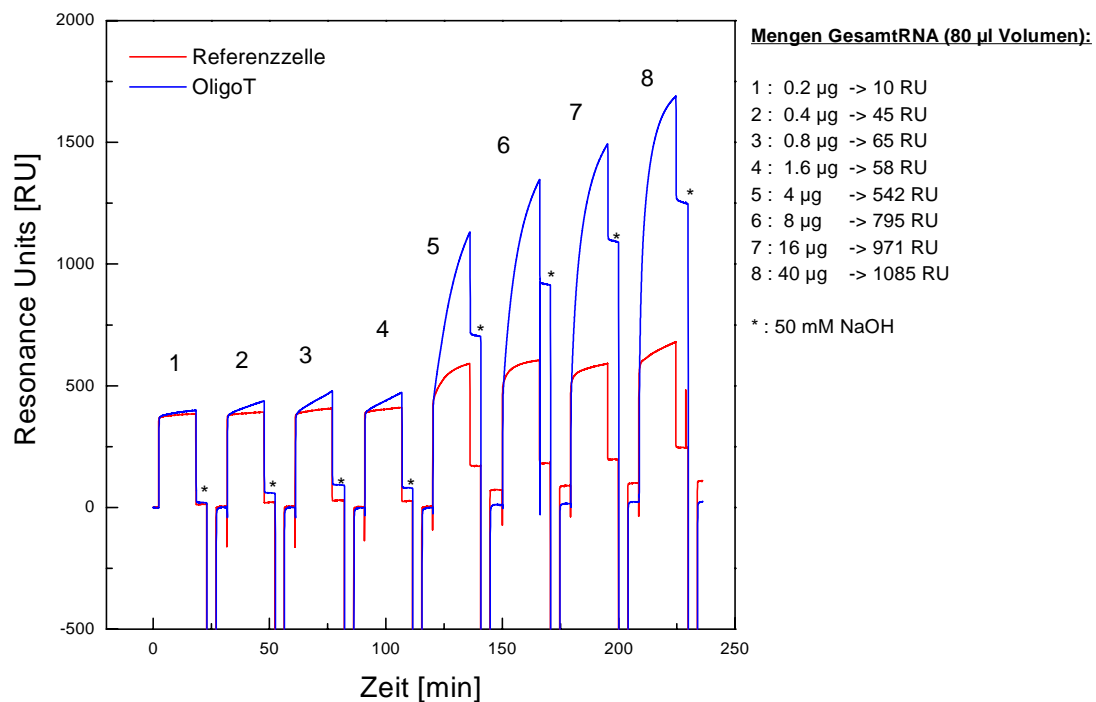


Abb. 5.11.: BIAcore-Meßzyklus einer Hybridisierungsreaktion von isolierter Total-RNA aus *S. cerevisiae* an eine Biotin-OligoT (24-mer, 606 RU)-modifizierte Streptavidinoberfläche. Nach einem jeweils 16-minütigen Hybridisierungszyklus wurde mit 2 xSSC gespült und anschließend mit 50 mM NaOH regeneriert. Im Volumen von 80 μ l wurden 0.2 – 40 μ g Total-RNA aufgetragen. Zur Bestimmung der angegebenen RU-Werte mußten die Werte der Referenzzelle jeweils subtrahiert werden.

Die meßbare unspezifische Anlagerung der komplexen Total-RNA-Mischung an die Streptavidin-Referenzzelle betrug 13.6 (\pm 6.5) % vom spezifischen Signal, ein im Vergleich zu unspezifischen Oberflächenwechselwirkungen von kleinen Oligonukleotiden hoher Wert (s. Kap. III. 3.4). Abbildung 5.12. faßt die erzielten Ergebnisse mehrerer Meßzyklen, die alle über eine Fließzelle (Biotin-OligoT: 606 RU) geführt worden sind, zusammen. Dabei ist der Response für die unspezifische Anlagerung der Total-RNA an die Streptavidinmatrix bereits subtrahiert.

Über das Hybridisierungsverhältnis konnte man bei diesen Experimenten keine Aussage treffen, da eine inhomogene Mischung verschieden langer mRNA-Moleküle hybridisiert wurden. Deutlich wurde jedoch, daß mindestens 0.4 μ g Total-RNA notwendig für ein signifikantes Signal war und bei Auftrag von 30 μ g Total-RNA eine Sättigung der Oberfläche erreicht wurde:

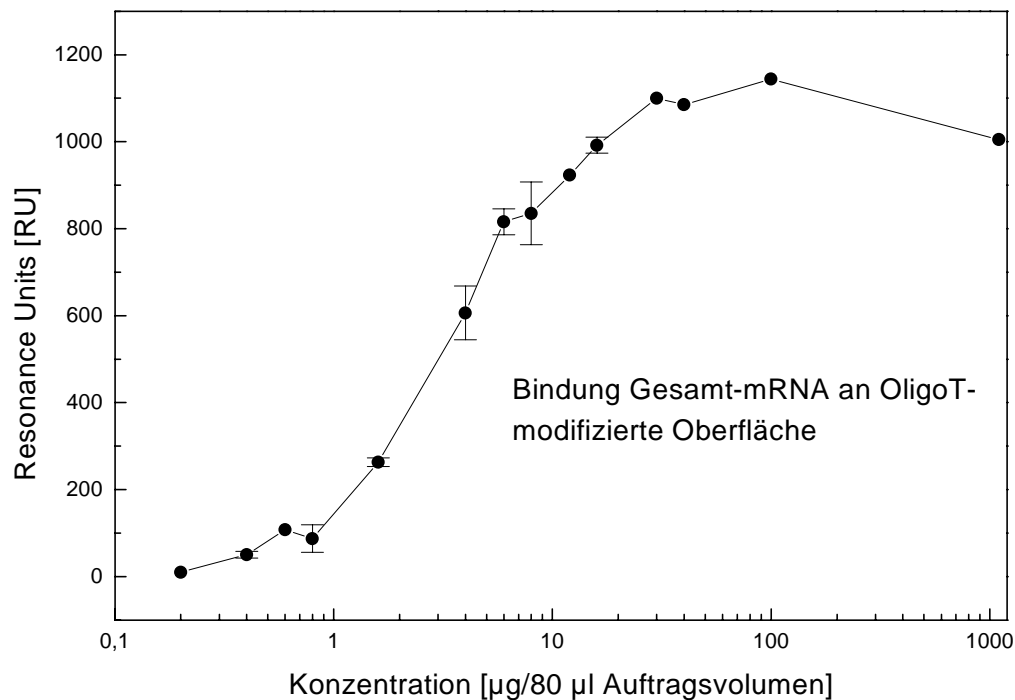


Abb. 5.12.: Hybridisierung von verschiedenen Mengen Total-RNA an eine BIAcore-Sensoroberfläche, die mit einem biotinylierten OligoT vorbeschichtet wurde.

In der Folge wurde versucht, durch den Einsatz OligoT-beschichteter Magnetpartikel die Gesamt-mRNA aus dem Zelllysate zu isolieren und aufzukonzentrieren, um erstens unspezifische Bindungseffekte z. B. der rRNA auszuschließen, und zweitens eine spezifische mRNA, die u. U. in nur wenigen Kopienzahlen pro Zelle vorlag, in höheren Konzentrationen zu erhalten. Diese wäre essentiell, um mit Hilfe des optischen Biosensors ein signifikantes Signal für die Hybridisierung zu erzeugen.

Aus 1 mg Total-RNA-Lösung ergab sich mit Hilfe der Magnetpartikel eine Ausbeute von 135 µg/ml mRNA, und somit ein Anteil von ~13.5 % an der Total-RNA (photometrisch bestimmt nach Kap. I. 4.4.). Geht man davon aus, daß nur ca. 1 – 5% der Total-RNA mRNA ist (Tab. 1.2. und Cleaver *et al.* 1996), muß man annehmen, daß in der Probe noch Bestandteile anderer RNA-Arten vorhanden waren.

Abb. 5.13. zeigt, daß es unter Verwendung der aufgereinigten mRNA-Proben möglich war, die Nachweisgrenze von 0.4 µg Total-RNA um den Faktor 30 auf 13.5 ng zu senken. Beide Graphiken repräsentieren zwei Meßzyklen unterschiedlicher Konzentrationen, die auf derselben Fließzelle durchgeführt wurden:

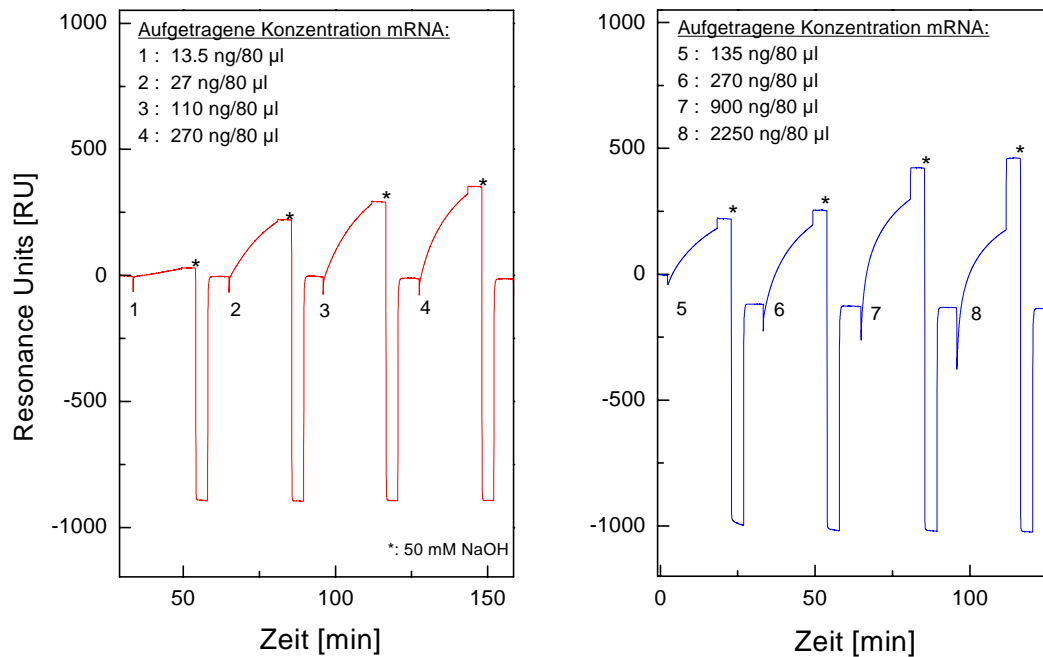


Abb. 5.13.: Hybridisierung von verschiedenen Konzentrationen an aufgereinigter mRNA an eine BIAcore-Sensoroberfläche, die mit einem biotinylierten OligoT vorbeschichtet wurde. Der linke Meßzyklus zeigt die Rohdaten für den Konzentrationsbereich von 13.5-270 ng/80µl Auftragsvolumen, während der rechte Meßzyklus den Bereich von 135-2250 ng/80 µl abdeckt. Regeneriert wurde jeweils mit 50 mM NaOH-Lösung.

Nicht dargestellt sind die unspezifischen Bindungen an die Streptavidinmatrix, die jedoch in der nächsten, zusammenfassenden Abb. 5.14. berücksichtigt wurden.

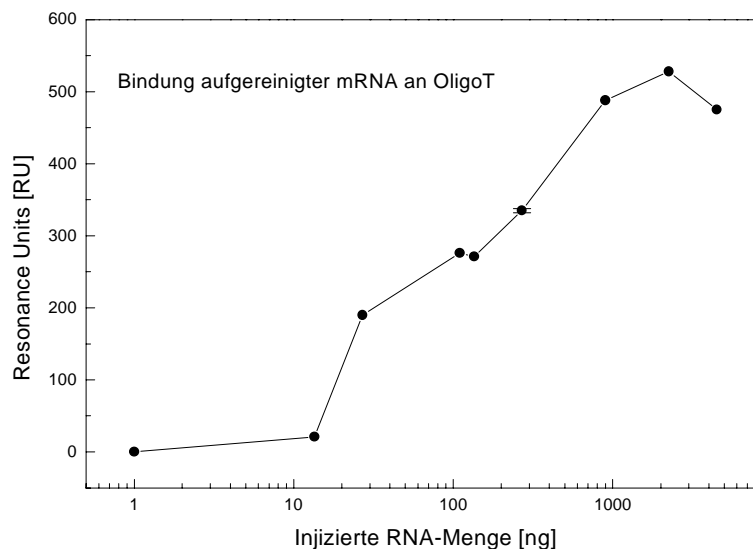


Abb. 5.14.: Hybridisierung von aufgereinigten mRNA-Proben an eine BIAcore-Sensoroberfläche. Die Darstellung ist das Ergebnis mehrerer Meßzyklen.

5.3.2. Verfolgung des RNA-Verlaufs während einer *Pichia Pastoris*-Fermentation

Während der Hefe-Fermentation wurden zu 16 verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, die zur Charakterisierung des mRNA-Status mit dem BIAcore verwendet wurden. Abb. 5.15. zeigt die Entwicklung der Gesamt-mRNA der einzelnen Proben, die über einen Zeitraum von 86.5 h gewonnen wurden. Injiziert wurden dabei Total-RNA-Lösungen, d.h. es wurden keine weiteren Aufreinigungsschritte unternommen, um die Gesamt-mRNA zu isolieren. (Die erste isolierte Probe wurde jedoch nicht für die BIAcore-Messungen herangezogen, da die Konzentration an Total-RNA aufgrund der geringen Zellmasse zu klein war). In der Graphik markiert wurde die Zufütterung von Glycerin, die das Zellwachstum stimulierte. Deutlich zu erkennen war dies durch Zunahme der Gesamt-mRNA zwischen 20 h (Glycerinzugabe) bis zur nächsten Probe bei 30 h, die ein um ca. 60 % höheres Signal zeigte. Der zweite Pfeil markiert die Zugabe von Methanol, mit der die Expression der Luziferase induziert wurde. Allerdings war damit kein detektierbarer Anstieg der Gesamt-mRNA verbunden:

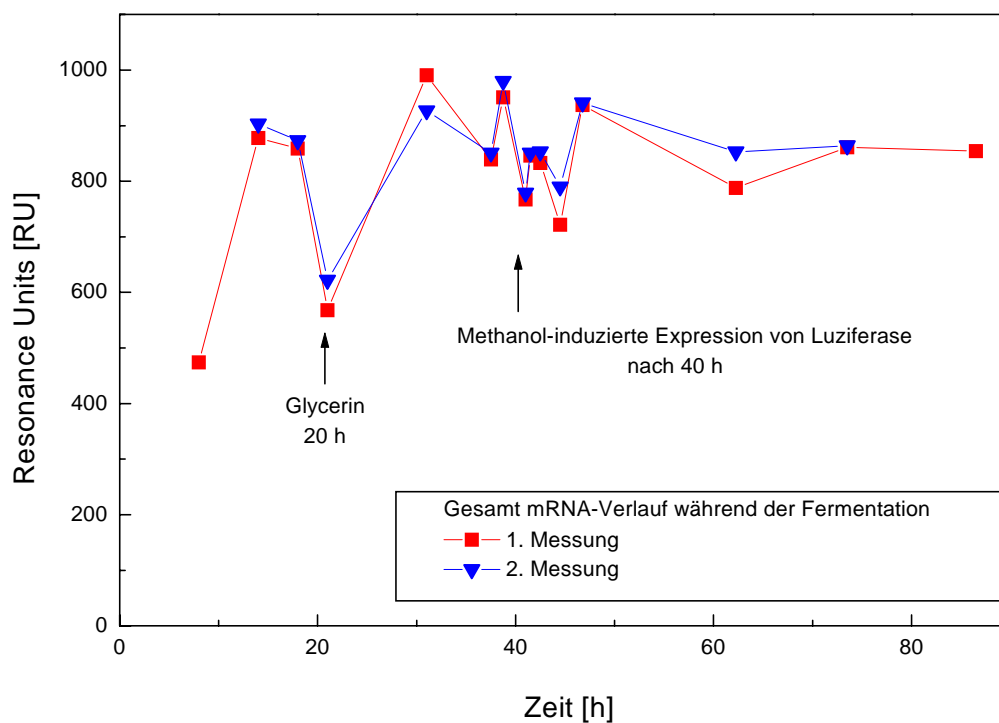


Abb. 5.15.: Verlauf der Gesamt-mRNA während einer *Pichia Pastoris*-Fermentation ermittelt durch Hybridisierung des PolyA⁺-Endes der Nukleinsäure an eine mit OligoT vorbeschichtete BIAcore-Sensoroberfläche. Die Proben (Auftrag je 5 µg in 80 µl Volumen) wurden jeweils zweimal vermessen, wobei die Abweichung der Meßpunkte bei 0.2 bis maximal 6.4 % lag.

In parallel durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, daß das Protein in geringen Mengen schon *vor* der eigentlichen Induktion mit Methanol (nach 40 h) vorhanden war. Ein enzymatischer Biolumineszenztest mit Hilfe von Luziferin und ATP ergab jedoch einen starken Anstieg der Aktivität ca. 1-2 h nach der Methanol-Induktion der Expression (Eckert, 1999). Der Nachweis der spezifischen Luziferase-mRNA gelang ab Probe 9 mit Hilfe des Northern Blots.

Mit drei ausgewählten Proben sollte nun untersucht werden, ob die spezifische Luziferase-mRNA nachweisbar war. Dazu wurde Probe Nr. 3 aus der Batch-Phase der Fermentation verwendet, bei der noch keine Luziferase-mRNA vorhanden sein dürfte. Die zweite Probe (Nr. 8) verwendete Material, das 60 min nach der Induktion der Expression, die dritte Probe (Nr. 15) 46.5 h danach isoliert wurde:

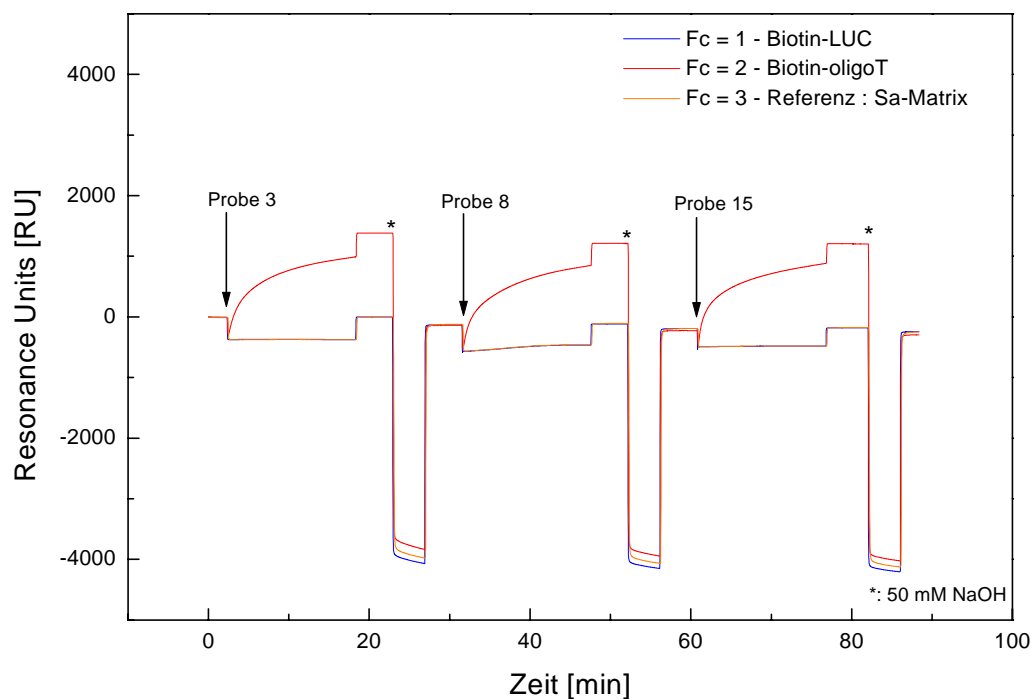


Abb. 5.16.: BIAcore-Meßzyklus zum Nachweis spezifischer Luziferase-mRNA in drei Fermenterproben. Die Proben, die in einer Konzentration von 5 µg/80µl Volumen aufgetragen wurden, erzeugten nach Subtraktion der unspezifischen Bindung auf den Biotin-OligoT-beschichteten Fließkanal ein Signal von 872 RU (Nr. 3), 877 RU (Nr. 9) und 954 RU (Nr. 15).

Deutlich zeigte sich, daß keine Hybridisierung einer spezifischen Luziferase-mRNA an dem komplementären Gegenstrang detektierbar war. Das Signal des Biotin-LUC-Fließkanals entsprach jeweils dem Signal für die unspezifische Anlagerung an die Streptavidinmatrix.

Um dennoch Hybridisierung zwischen dem spezifischen Oligonukleotid und der Proben-mRNA zu erreichen, wurde die Gesamt-mRNA der untersuchten Probe mit Hilfe von Magnetbeads isoliert und aufkonzentriert. Jedoch konnte auch dieser experimentelle Ablauf in Hinblick auf den Nachweis spezifischer Luziferase-mRNA keine zufriedenstellenden Resultate liefern. Abbildung 5.17. zeigt die Bindung aufgereinigter Gesamt-mRNA an dem Luziferase-Oligonukleotid Biotin-LUC im Vergleich zur Hybridisierung an OligoT:

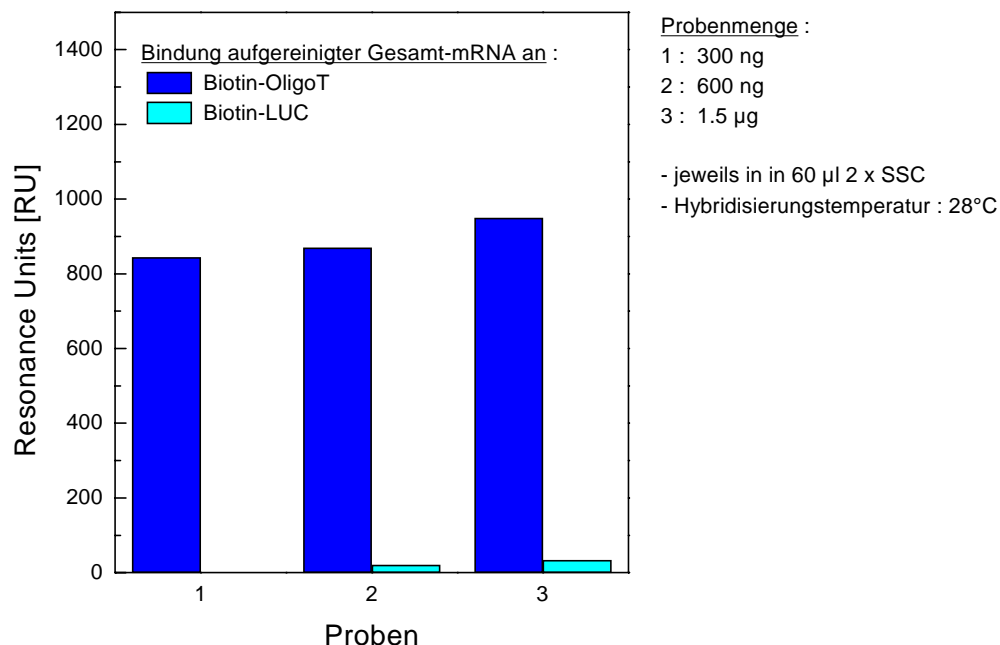


Abb. 5.17.: Hybridisierung aufgereinigter Gesamt-mRNA-Proben an Fließzellen, die mit Biotin-OligoT und dem für die Luziferase spezifischen Biotin-LUC beschichtet waren.

Das geringe Signal der spezifischen Fließzelle entsprach dabei der unspezifischen Bindung an einer Fließzelle, die mit einem nicht-komplementären Oligonukleotid beschichtet war. Abschließend wurde eine andere Sonde verwendet, um die Hybridisierungseffektivität zwischen oberflächengebundenem Oligo und Luziferase-mRNA zu erhöhen. Die 24 bp-Sequenz der Sonde Biotin-LUC lag innerhalb der gesuchten mRNA, während die neue Sonde Biotin-End-LUC komplementär zu einer endständigen Sequenz war. Aber auch dieser Ansatz war nicht geeignet, um die mRNA zu hybridisieren.

5.3.3. Schlußfolgerungen :

- Das PolyA⁺-Ende der mRNA kann genutzt werden, um die Moleküle an eine mit OligoT-beschichtete Sensoroberfläche zu hybridisieren. 0.4 µg/80 µl der Total-RNA konnte noch nachgewiesen werden.
- Die unspezifische Bindung von Total-RNA war mit ca. 13.6 % vom spezifischen Signal hoch.
- Magnetpartikel ermöglichten die Isolation der Gesamt-mRNA aus der Total-RNA. Die Hybridisierung dieser aufgereinigten Proben an OligoT modifizierte Oberflächen konnte die Nachweisgrenze für Gesamt-mRNA auf ca. 13.5 ng/80 µl verschieben.
- Der Verlauf der Gesamt-mRNA-Entwicklung konnte mit dem BIAcore während einer *Pichia Pastoris*-Fermentation reproduzierbar verfolgt werden.
- Wachstums- und Hungerphasen waren dabei verfolgbar.
- Durch die Induktion der Luziferase-Expression war keine Zunahme der Gesamt-mRNA detektierbar.
- Die Bildung der spezifischen Luziferase-mRNA konnte vermutlich aufgrund der zu niedrigen Konzentration trotz Aufreinigung mittels Magnetbeads nicht nachgewiesen werden.

Diskussion

1. Atom-Kraftmikroskop

Untersuchungen der Ta₂O₅-Lichtwellenleiter mit dem AFM

Ziel der Untersuchungen war es, die Sensoroberfläche in ihrem Erscheinungsbild zu charakterisieren und Daten zu erhalten, die Aufschluß über den Grad der Proteinbedeckung geben.

Deutlich zu erkennen waren auf unbehandelten Chips etwa 2-8 nm tiefe, irreguläre Riefen in der Oberfläche, die nicht Teil des eingepprägten Gitters, sondern vermutlich durch den Herstellungsprozeß bedingt waren (Heuberger *et al.*, 1986 und Lukosz *et al.*, 1983). Das Einwirken eines Gemisches aus H₂SO₄/H₂O₂ (70:30) über mehrere Stunden entfernte durch Auflösung des Trägermaterials diese Rillenstruktur vollständig.

Visualisierung und Charakterisierung der Proteinbeschichtung auf der Sensoroberfläche

Um die Proteinschicht zu charakterisieren, sollten die Ausmaße eines immobilisierten Einzelproteins gemessen werden. Entscheidend für die molekulare Auflösung des Instruments ist der *Kurvenradius* der gewählten Spitze (s. Kap. II. 2.2.1.). Ab einer bestimmten Proteinkonzentration können keine Einzelmoleküle mehr identifiziert werden, weil die Spitze größenbedingt nicht mehr in Zwischenräume eindringen kann. Bei Verwendung von 0.1 bis 1 µg/ml Avidin zur Immobilisierung wurde dieser kritische Wert unterschritten, wobei höhere Proteinkonzentrationen bis zu 100 µg/ml eine geschlossene Oberfläche zeigten (s. Kap. III. 1.3.2.). Die Abschätzung dieser kritischen Konzentration erfolgte durch einfaches Auszählen der Einzelmoleküle innerhalb einer festgelegten Fläche und anschließender Extrapolation. Aus einer Menge von ca. $1.65 \cdot 10^9$ Moleküle/mm² berechnete sich eine Oberflächenbeladung von ca. 180 pg Avidin /mm², was mit einem Literaturwert (Kosseck *et al.*, 1998) von 200 pg/mm² gut übereinstimmte.

Die bestimmten Ausmaße des Proteins (s. u.) wurden mit Röntgenstrukturuntersuchungen (RSU) verglichen, die für Avidin eine Ausdehnung von 4.1 x 5.5 x 5.5 nm ($\text{Volumen}_{\text{Ellipsoid}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c = \sim 520 \text{ nm}^3$) ermittelten (Wichek *et al.*, 1990).

Da die AFM-Untersuchungen des Avidins im getrockneten Zustand erfolgten, waren keine Ausdehnungen analog dem Proteinkristall zu erwarten. Gemessen wurde eine durchschnittliche Abmessung von 2.5 (Länge) x 2.5 (Breite) x 1.7 (Höhe) nm, so daß das Volumen des postuliert ellipsoiden Körpers auf $\sim 45 \text{ nm}^3$ bestimmt worden ist.

Die Struktur des Proteins schrumpfte durch den Wasserverlust deutlich auf ca. 9 % des Wertes der 3D-Kristallstruktur. Messungen in flüssiger Phase mittels AFM haben dagegen eine Höhenausdehnung von 5 nm statt 1.7 nm ergeben (Kosseck *et al.*, 1998), was den Daten der RSU deutlich mehr entspricht.

Schwierigkeiten bereitete bei der Charakterisierung der Proteinbedeckung jedoch der Umstand, daß die Ta₂O₅-Oberfläche aus sphärischen, gesputterten Strukturen bestand, die mit einer durchschnittlichen Höhe von 1.5 nm in etwa der Größe von Avidinmolekülen entsprachen. Durch erhöhten Kraftaufwand der Spitze auf die proteinbeschichtete Oberfläche konnte jedoch adsorptiv oder über Biotinmoleküle gebundenes Avidin leicht bewegt werden, so daß die Ta₂O₅-Unterlage sichtbar wurde. Nach Behandlung für wenige Minuten war die Proteinschicht soweit entfernt, daß die Dicke an den Rändern meßbar wurde.

Die ermittelten 2.8-3.0 nm lagen dabei *über* der einer Monolage Avidin, die auf dem glatten Träger Mica auf ca. 1.7 nm bestimmt wurde. Die vergleichsweise rauhe Oberfläche des Lichtwellenleiters erschwerte jedoch eine exakte Bestimmung der Schichtdicke.

Knapp *et al.* (1995) beschrieben eine ähnliche Oberflächenmanipulation durch AFM-Spitzen. Dabei konnte die schichtweise Entfernung bzw. Glättung von Langmuir-Blodgett-Filmen durch erhöhten Kraftaufwand gezeigt werden. Desweiteren sind eine Vielzahl weiterer Arbeiten veröffentlicht worden, die gezielte Wechselwirkung von AFM-Spitzen mit untersuchten Proben beschrieben (z. B. Bustamante *et al.*, 1997 und Engel *et al.*, 1999).

Untersuchungen zur Bindungseigenschaft von DNA an modifizierten Trägern

Variation der Immobilisierungsmethode

Als Beispiel für die Messungen wurde das 2686 bp große Plasmid pUC19 benutzt, da kurze Oligonukleotidstränge trotz glatter Oberfläche nur schlecht sicht- und unterscheidbar waren. Das Plasmid dagegen war für AFM-Messungen optimal geeignet, da es eine leicht zu beobachtende Größe hat.

Ein weiterer Vorteil der Nutzung von Plasmiden waren die unterschiedlichen Strukturen der DNA. So war die im entspannten Zustand runde Form des Plasmids von der verknäulten, sog. superspiralisierten ("coiled" oder "supercoiled") Struktur leicht zu diskriminieren. Diese Eigenschaft der ringförmigen Nukleinsäure konnte genutzt werden, um die verschiedenen Bindungsmethoden zu charakterisieren. Denn von der Wahl der Immobilisierungsmethode hing ab, ob vermehrt spiralisiertes oder vermehrt relaxiertes Plasmid sichtbar war.

Die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Daten für die DNA beschrieben zwei verschiedene Typen, wobei die B-DNA („Watson-Crick-DNA“) mit ca. 99%igem Vorkommen der zellulären DNA nahekommt (Knippers *et al.*, 1997). Der A-Typ war bei den durchgeführten Experimenten im Trocknen relevant, da sich diese starre DNA-Form bildet, wenn der Wassergehalt stark absinkt. Damit ist einerseits ein Verkürzen des Abstandes der Basenpaare um ca. 25% verbunden, wie auch eine Zunahme der Breite der Helix. Die B-Form sollte dagegen bei Messungen in Flüssigkeit auftreten.

Verglichen mit den Daten der Röntgenstrukturanalytik (\varnothing Helix : 2.55 nm für A-Form, 2.37 nm für die B-Form) lagen die Werte, die für die Höhenausdehnung der oberflächengebundenen Nukleinsäure bestimmt wurden, bei nur ca. 30% für die getrocknete bzw. ca. 70 % für die in Flüssigkeit gemessene DNA. Dieser Zusammenhang, der auch von anderen Gruppen bestätigt wurde (Hansma *et al.*, 1996, Lyubchenko *et al.*, 1993, Murray *et al.*, 1993, Tanigawa *et al.*, 1998), war einerseits bedingt durch die (wenn auch geringe) Krafteinwirkung während des Scannens, die eine Kompression der DNA bewirken kann. Andererseits war mit einer Strukturveränderung beim Übergang von der dreidimensionalen Lösungsphase in die zweidimensionale gebundene Phase zu rechnen, da Wechselwirkungen mit Oberflächenladungen auftreten.

Die Daten für die Breite der DNA wichen wie erwartet stärker von der Röntgenstruktur der Helix ab (Faktor 3 bis 6; Vergleichbar : Murray *et al.*, 1993 und Shaiu *et al.*, 1993). Bei den experimentell bestimmten Werten spielen in Bezug auf Unschärfe zwei wesentliche Faktoren eine Rolle:

Erstens war der oben erwähnte endliche Kurvenradius (5-60 nm) der Spitze relevant, der eine Breitenbestimmung wesentlich mehr beeinflusst als die Höhenbestimmung. Ein großes Problem waren die einzelnen Spitzen, die z. Z. nicht reproduzierbar genug hergestellt werden können. Für einen 5 nm großen Körper mißt eine Spitze mit Kurvenradius 40 nm theoretisch eine Breite von 28 nm, während mit einer feineren Spitze von 5 nm Kurvenradius für den selben Körper nur 10 nm gemessen werden (Kosseck, 1998).

Ein zweiter Grund für die Unschärfe der Breitenmessung war die Bindung der Nukleinsäure, die zwar stabil gegenüber Desorption war, jedoch eine teilweise Beweglichkeit der Stränge auf der Oberfläche zuließ. Durch die angenommene geringe Dichte an Aminofunktionen des APTS hat die DNA Mobilitätsfreiheitsgrade, die dem Molekül während des Abtastens mit der AFM-Spitze ein Ausweichen ermöglichen. Das erhaltende Abbild der DNA erschien dadurch

breiter. Interne Standards, wie reproduzierbar große Goldkolloide als Vergleich (Shaiu *et al.*, 1993) könnten eine Abschätzung der Unschärfe erleichtern.

Theoretische Beschreibung der Bindung von DNA an eine Oxid-Festphase

Um die Anlagerung der Plasmid-DNA theoretisch zu betrachten, unterteilt man den Prozeß zuerst in 3 Phasen :

1. Diffusion (oder genereller : Transport) der Nukleinsäure zur Oberfläche.
2. Anlagerung : Übergang von dem dreimensionalen (3D) in den zweidimensionalen (2D)-Zustand
3. Bewegung auf der Oberfläche

Wichtig für die Betrachtung der Anlagerung sollen hier die letzten beiden Prozesse sein, bei denen in den AFM-Untersuchungen je nach Modifikation der Matrix ein unterschiedliches Verhalten ermittelt wurde.

Nach zwei Haupt Gesichtspunkten sollen die Oberflächeneigenschaften im folgenden unterschieden werden :

1. eine Oberfläche, die elektrostatisch stark mit der Nukleinsäure wechselwirkt.
2. eine Oberfläche, die elektrostatisch schwach mit der Nukleinsäure wechselwirkt.

Geht man bei der Anlagerung der DNA von *hoher Bindungsenergie* zwischen DNA und Oberfläche aus, erfolgt die Bindung schnell, effektiv und u. U. irreversibel. Die Struktur des Plasmids könnte vorwiegend erhalten bleiben; das zweidimensionale Bild ist annähernd ein Abbild des in Lösung vorkommenden Plasmids. (Dieses liegt meist bedingt durch partielle Aufwindungen in superspiralisierte Form vor (Lehniger *et al.*, 1994). Zur transkriptiven Ablesung der genetischen Information wird der Strang enzymatisch an einer bestimmten Stelle geöffnet, wobei durch die Aufwindung eine Spannung induziert wird, der die DNA durch Spiralisierung entgegenwirkt.)

Planares Mica besitzt in ca. 0.5 nm Abstand Hydroxylfunktionen, die über monovalente Metallionen abgesättigt sind (Nishimura *et al.*, 1994). Taucht man Mica in Puffer mit divalenten Kationen (Mg^{2+} oder Ca^{2+}), kommt es zum teilweisen Austausch der ein- gegen zweiwertige Ionen, welche effektiv zur elektrostatischen Bindung des negativen Phosphat-Rückgrats der DNA dienen können. Eine hohe Dichte an Metallionen kann die stabile Bindung der Plasmide an die Oberfläche erklären, jedoch müßten zur lateralen Bewegung der DNA eine hohe Anzahl von Coulomb-Wechselwirkungen gelöst werden. Damit sich DNA-

Moleküle auf der Oberfläche ausbreiten können, müßte die Mobilität der Nukleinsäure auf der Oberfläche erleichtert sein. Die Beweglichkeit des Moleküls spiegelt daher die Oberflächenladungen wider.

Eine energetische Triebfeder, die dennoch eine Mobilität der DNA auf dem Mica ermöglichen sollte, ist das Bestreben, möglichst viele negativ geladenen Phosphatgruppen in räumliche Nähe zu Metallionen zu bringen. Wendet man diese Betrachtungsweise auf die experimentellen Ergebnisse an, die bei Magnesiumionen im Vergleich zum Calciumion eine größere Anzahl von entspannten Plasmiden zeigten, so deutet das darauf hin, daß bei ersteren höhere Mobilität möglich war. Unterschiede zwischen den Ionen können unterschiedliche Ursachen haben, wie z. B. die aufgrund des Ionenradius sterisch behinderte Bindung an die Sauerstoffatome des Mica, die in hexagonalen Kavitäten in der basalen Struktur des Micas sitzen (Rivetti *et al.*, 1996). Magnesiumionen passen im nicht-hydratisierten Zustand im Gegensatz zu Ba^{2+} , Sr^{2+} und Ca^{2+} in die Vertiefungen, so daß die positive Oberflächenladungsdichte größer sein könnte. Diese unterstützt die Ausbreitung der Moleküle, um die Zahl der Wechselwirkungen mit Oberflächenladungen möglichst zu maximieren. (Systematische Studien zum Einfluß der Na^+ - und Mg^{2+} -Ionenkonzentration auf die Struktur der DNA in: Rybenkov *et al.*, 1997).

Ist die Bindung jedoch aufgrund weniger positiver Ladungen auf der Oberfläche *schwach*, so erfolgt der Übergang vom gelösten in den gebundenen Zustand nur langsam. Eine equilibrierende Bewegung auf der Oberfläche ist noch leichter möglich als beim Magnesium, was dazu führt, daß das Plasmid in einen thermodynamisch günstigen, entspannten Zustand streben kann. Wie oben erwähnt, ist der entspannte dem superspiralisierten Ring energetisch bevorteilt. Die DNA kann leichter dissoziieren, da kaum starke elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Wie beobachtet, bewegte sich die DNA im Falle des langsamen Eintrocknenlassen des Nukleinsäurespots sehr leicht. Ein Spülen der Oberfläche führte dazu, daß keine DNA gebunden blieb.

Mit Mica, das in destilliertem Wasser gelagert wurde, fanden Rivetti *et al.* (1996), daß die DNA-Moleküle *nicht equilibrierten*, sondern fixiert wurden. Zurückzuführen sei dieser Effekt auf einen H^+ -Austausch der K^+ -Ionen des Micas, die in den oben erwähnten hexagonalen Kavitäten der basalen Struktur des Micas sitzen. Dadurch wird die Oberflächenladung stärker negativ, so daß die Bindung schwach ist und zusätzlich Coulomb-Anziehungskräfte als thermodynamische Triebfeder erhöhter Mobilität fehlen.

Bei APTS-Behandlung der Oxidoberfläche waren mehrere DNA-Strukturen (entspannte, rosettenförmige und spiralisierte Plasmide) nebeneinander zu erkennen, die mehrere Schlußfolgerungen zuließen. Durch die Silanisierung standen Aminogruppen zur Verfügung, die jedoch in geringer Dichte vorhanden waren. Ein aus experimentellen Daten abgeleiteter mittlerer Abstand der Aminogruppen von 25 ± 10 nm (Lyubchenko *et al.*, 1997) führt zu einer Dichte von ca. $1.6 \cdot 10^9$ Aminogruppen pro mm^2 . Postulieren kann man daraus einen nur lockeren Kontakt zwischen DNA-Helix und Aminogruppen (3 bis 9 Helixwindungen pro Aminogruppe), weshalb partielle Dissoziationen und Bewegungen des Plasmids auf der Oberfläche möglich waren.

Geht man dagegen von einer vollständigen Absättigung der Mica-Oberfläche mit divalenten Ca-Kationen aus (s. o., bei einem mittleren Abstand von 0.5 nm), so stehen bei der Silanisierung nur ca. 0.04% positiver Ladungen verglichen mit der Ca^{2+} -verbrückenden Oberfläche zur Verfügung. Das erklärt die höhere Mobilität der DNA auf dem Träger, die mittels AFM beobachtbar war. Da die Coulomb-Wechselwirkungen als gering angenommen werden können, ist ein dynamisches Verhalten der Moleküle im Vergleich zu dem Ionenverbrückten System leichter möglich.

Trotz der vergleichsweise geringen Dichte der Aminogruppen auf der Oberfläche war die Bindung zwischen den DNA-Strängen und der silanisierten Oberfläche gegenüber Spülschritten und in Flüssigkeitsmessungen stabil. Da sich jedoch trotzdem rosettenförmige bzw. spiralisierte Plasmide zeigten, konnte man von einer nicht-uniformen APTS-Oberfläche ausgehen, die u. U. APTS-Clusterbildung aufwies. Vandenberg *et al.* zeigten bereits 1991 die Bildung solcher Cluster, die eine nicht gleichförmige Silanschicht verursachen und die erwähnten DNA-Strukturen ermöglichen könnten.

Abschließend sollen die verknäulten Strukturen der Plasmide diskutiert werden, die beobachtet wurden, wenn man die DNA in 10 mM Magnesiumnitrat-Lösung vorinkubierte. Die divalenten Ionen sind in der Lage, eine verbrückende Funktion zwischen den Phosphatgruppen der Nukleinsäure einzunehmen, so daß eine starke Spiralisierung und Verknäulung durch Abschirmung der negativen Ladungen möglich wird. Der Einfluß von Mg^{2+} -Ionen auf die DNA-Struktur wurde sowohl mit dem AFM (Bezanilla *et al.*, 1995) sowie in früheren Arbeit mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen beschrieben (Bednar *et al.*, 1994).

Bewertung des Einsatzes eines Atom-Kraftmikroskopes zur Untersuchung von Biosensoroberflächen

Bei der Anwendung von DNA-Sensoren kommen häufig Oberflächen zum Einsatz, die entweder kurze Nukleinsäuremoleküle als Sonden für eine Hybridisierungsreaktion chemisch direkt koppeln (Beier *et al.*, 1999) oder Bindungsmediatoren wie das Avidin-Biotin-System einsetzen (Bier *et al.*, 1996). Essentiell für die Entwicklung von Sensoren ist Wissen über das Verhalten der Nukleinsäurestränge auf der Sensoroberfläche. Modifikationen im Laufpuffer, der z. B. divalente, verbrückend wirkende Ionen enthält, kann u. U. Agglomeration der Sondenstränge bewirken, so daß weniger Sonden-Moleküle zur eigentlichen Hybridisierungsreaktion zur Verfügung stehen. Bei Verwendung der silanisierten Oberfläche ist vereinfacht zu erwarten, daß die Oligonukleotide sich horizontal auf die positiv geladenen Silanschicht legen (Chan *et al.*, 1997). Das AFM kann als analytisches Instrument wertvolle Aussagen zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Oligonukleotiden und Proteinen geben, die zur Verbesserung der Effektivität des Sensors verwendet werden können. Feinere Spitzen werden selbst kleine Oligonukleotide sichtbar machen können.

Für die Arbeiten mit den Ta₂O₅-Lichtwellenleiterchips konnte der Bedeckungsgrad an Avidin auf Mono- bis Bilayer ermittelt werden. Messungen und Modellrechnungen am Gitterkoppler, durchgeführt von Clerc *et al.* (1997), können die AFM-Ergebnisse untermauern: Experimentell haben sie eine Dicke der Schicht von 3.3 ± 0.7 nm gemessen, was in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gefundenen 2.8-3.0 nm steht.

Durch die Verwendung des AFM können neben Erkenntnissen zur Rauigkeit von Oberflächen und Bedeckungsgrad mit Molekülen auch *Kraftmessungen* durchgeführt werden, die Aussagen über die Stärke von Wechselwirkungen von Affinitätspartnern ermöglichen. So untersuchten Lee *et al.* (1994) die Bindungskräfte zwischen einem Oberflächen-gebundenen einzelsträngigen 20-mer und einem komplementären Strang, der an die AFM-Spitze gebunden war.

2. Messungen am Gitterkoppler

Immobilisierungen von Avidin bzw. Streptavidin auf Ta₂O₅-Lichtwellenleiter

Die Bindung des in dieser Arbeit verwendeten Rezeptorproteins an drei verschieden vorbehandelten Oberflächen zeigte unterschiedliche Verläufe. So lagerte sich das Protein schnell und sehr stabil durch spezifische Bindungsvermittlung über oberflächengebundene Biotinmoleküle an, während die adsorptive Anlagerung an silanisierte bzw. rohe Ta₂O₅-Oberflächen durch eine deutlich verlangsamte Anlagerungskinetik charakterisiert war. Aufgrund der fehlenden starken Interaktion zeigte sich im Gegensatz zur spezifischen Biotinbindung auch eine langsame Oberflächendissoziation, deren Verlauf bis zu einer Gleichgewichtseinstellung abgewartet werden mußte, um mit den eigentlichen Messungen zu beginnen.

Bemerkenswert war die Anlagerung des Avidins an APTS-silanisierte Oberflächen. Das Protein besitzt eine positive Netzlading mit einem pI-Wert von 10.5 (Wilchek *et al.*, 1990). Eine APTS-silanisierte Oberfläche ist aufgrund der endständigen Aminofunktionen über einen weiten pH-Bereich ebenso positiv geladen ($pK \approx 10.6$, Bezanilla *et al.*, 1995), so daß eine vollständige Bedeckung mit Silan eine Anlagerung des positiv geladenen Avidins verhindern sollte. Da trotzdem eine signifikante Anlagerung gemessen wurde, wurden folgende Thesen zur Beschreibung des Ergebnisses aufgestellt:

1. Negativ geladene Aminogruppen, die auf der Proteinaußenseite lokalisiert sind, treten mit den Aminofunktionen des Silans in Wechselwirkung.
2. Glykosidische Reste des Avidins treten mit den Aminofunktionen des Silans in Wechselwirkung.
3. Die Dichte der Aminofunktionen war aufgrund des Silanisierungsprozesses begrenzt. Das Protein lagerte sich an nicht bedeckten Stellen an.

Experimentell wurde nachgewiesen, daß selbst deglycosyliertes Avidin effektiv an die APTS-silanisierte Oberfläche bindet. Eine Fluoreszenzaufnahme einer Gitterkopplerfließzelle soll einen Hinweis geben, daß der Silanisierungsprozeß für eine *unvollständige* und *inhomogene* Oberflächenbedeckung mit Aminofunktionen verantwortlich war. Die gezeigte Oberfläche repräsentiert den unteren Ausschnitt eines silanisierten Ta₂O₅-Chips, der mit einer ca. 2x8 mm großen Fließzelle bedeckt war. Über die Oberfläche wurde zuerst Avidin adsorptiv angelagert,

gefolgt von einer Bindungsreaktion mit einem Konjugat aus biotinyliertem Fluoreszein, einem Fluorophor, das bei einer eingestrahnten Wellenlänge von 496 nm Licht emittiert:

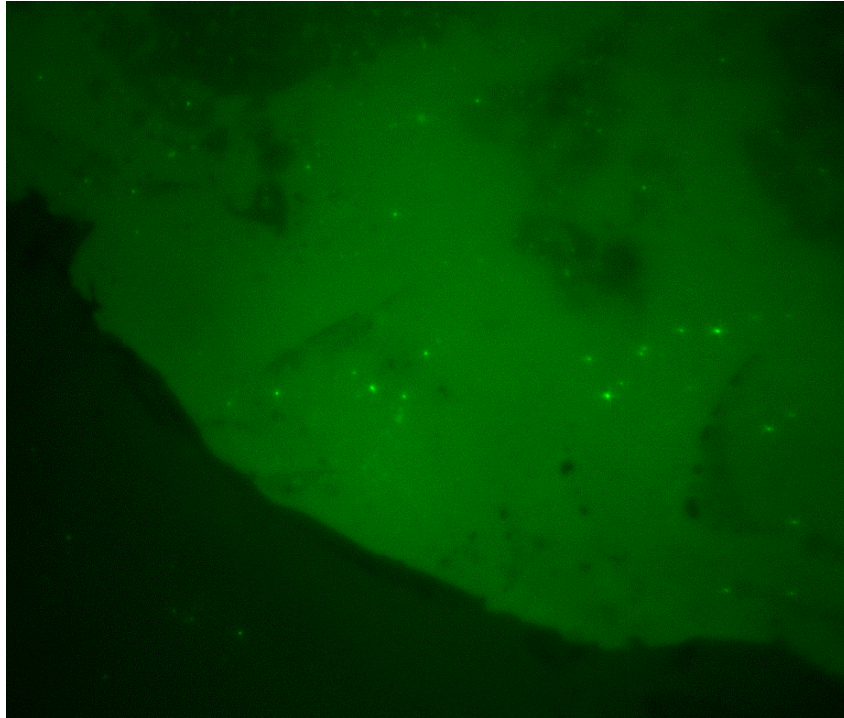


Abb. 6.1. : Silanisierte Ta_2O_5 -Oberfläche beschichtet mit Avidin ($\Delta N_{eff} = 4.1 \times 10^{-4}$) und einem Biotin-Fluoreszein-Konjugat (120 μM). Der Ausschnitt zeigt den unteren Rand der Gitterkopplerfließzelle. Aufgenommen wurde das Bild mit Hilfe einer CCD-Kamera, einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss und der IP Lab Spektrum 3.1-Software (Signal Analytics Corp.). Die Belichtung erfolgte für 10 s bei einem Verstärkungsparameter von 4.

Die Verteilung der Fluorophore vermittelt einen optischen, quantifizierbaren Eindruck über die inhomogene Verteilung der Rezeptorproteine. Vandenberg *et al.* (1991) finden ebenso unvollständige Silan-Beschichtungen an Oberflächen, deren Dichte von der Art der gewählten Silanisierungsmethode abhängt. Schließen muß man daraus, daß Silanisierungsprozesse, insbesondere wenn sie der kovalenten Kopplung von Rezeptoren dienen, einer Optimierung und Charakterisierung bedürfen.

Bindung biotinylierter Sonden

Gezeigt wurde hier, daß das Bindungsverhältnis von Avidin zu biotinyliertem Oligonukleotid max. 1:1.6 betrug.

Aus den experimentellen Daten wurde deutlich, daß unabhängig von der Methode der Proteinimmobilisierung eine jeweils ähnliche Menge an biotinylierten Oligonukleotid pro

gebundenem Avidin immobilisiert werden konnte. Da ein Avidin je 4 Biotinmoleküle binden kann, stehen theoretisch noch 3 Bindungstaschen für das Protein zur Verfügung, das spezifisch über eine planare, biotinylierte Oberfläche fixiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, daß trotz der Absättigung einer der Bindungstaschen durch die Immobilisierung an die Oberfläche keine signifikante Reduktion der Bindungseffektivität für weitere Biotinmoleküle im Vergleich zu den adsorptiven Methoden auftrat.

Auch bei rein adsorptiver Anlagerung war damit zu rechnen, daß ein bis zwei Bindungstaschen sterisch gehindert nicht zu erreichen sind, da diese gleichmäßig über das Protein verteilt liegen und dadurch immer teilweise unzugänglich sind.

Einfluß von Länge und Konzentration des Probenoligonukleotids

Die Bestimmung der *unteren Nachweisgrenze* für kurze Oligonukleotide machte deutlich, daß die Hybridisierung im Vergleich zu anderen Affinitätsreaktion (z. B. Avidin-Biotin-Wechselwirkung) von einer Vielzahl an Faktoren abhängig ist. Die Wahl dieser Faktoren, wie Temperatur oder Salzkonzentration bestimmten sehr eindeutig die hier definierte *Nachweisgrenze*. Um systemübergreifende Vergleiche verschiedener Transducer für die DNA-Analytik anzustellen, gilt es zusätzlich immer, die jeweiligen Hybridisierungsbedingungen zu berücksichtigen.

Betrachtet man beispielsweise die Schmelztemperatur (Temperatur, bei der 50 % der Oligonukleotide hybridisiert vorliegen) des 8-mers nach Gleichung (1), erhält man 17.6°C bei einer Salzkonzentration von 1 M. Eine Hybridisierungstemperatur von 7-8 °C über der Schmelztemperatur bedeutet, daß weit weniger als 50 % der kurzen Nukleinsäurestränge eine Duplex bilden. Erhält man für die Anlagerung von biotinylierten Sonden den Mittelwert von $\Delta N_{\text{eff}} = 1.4 \cdot 10^{-4}$, dann errechnet sich bei theoretisch 10 % Duplexbildung auf der Sensoroberfläche eine Änderung des effektiven Brechungsindex bedingt durch das 8-mer auf $\Delta N_{\text{eff}} = 4 \cdot 10^{-6}$. Damit fällt die Hybridisierung für dieses Segment in den Bereich der unteren Nachweisgrenze des optischen Sensors. Ein höheres Signal für die Anlagerung kurzer Stränge wäre bei niedrigeren Temperaturen ($T_{\text{hyb}} = T_m - 5^\circ\text{C} \rightarrow \sim 12-13^\circ\text{C}$) zu realisieren.

Ist zusätzlich die Konzentration von Sonden auf dem Chip gering, reicht die Masseänderung durch Anlagerung selbst längerer Stücke nicht aus. Essentiell für den Nachweis kurzer Oligonukleotide ist daher neben stringenter Salzkonzentration und effektiver Hybridisierungstemperatur eine hohe Beladungsdichte an biotinylierten Molekülen auf der Oberfläche.

Die gewählte *Hybridisierungszeit* von 10-30 min müßte für die untersuchten Oligonukleotide ausreichend gewesen sein: So berechnet sich die Zeit $t_{1/2}$, nach Gleichung (2), bei der 50 % des 12-mers (mit $C = 5 \mu\text{M}$) hybridisiert ist, auf 1-2 s; damit stand mehr Zeit zur Verfügung, als zum Erreichen des Gleichgewichtszustands notwendig war.

Vergleicht man die erhaltenen Hybridisierungsraten mit Literaturwerten, so beschreibt Bier (1997) für ein 22-mer gemessen am Gitterkoppler eine Rate von 65 %, die ebenso Nielsson (1995) mit einem BIAcore für ein 22-mer gezeigt hat (64%). Hier wurde für ein vergleichbares 22-mer eine Hybridisierungsrate von ca. 32 % gefunden.

Nachweis von interkalierenden Verbindungen mit Hilfe des Gitterkopplers

Die Wechselwirkung niedermolekularer Substanzen mit DNA ist von großer Bedeutung für Toxizitätsuntersuchungen, Umweltanalytik (Wang *et al.*, 1996) und zur Entwicklung neuartiger Medikamente (Marzilli, 1990). 1997 haben Piehler *et al.* gezeigt, daß unter Verwendung von Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) als optischem Detektionsprinzip Interkalatoren bis zu 320 g/mol detektierbar sind. Da Gitterkoppler einen direkten Nachweis von Molekülen mit Größen unter 2000 g/mol nur bedingt erlauben, (Polzius, 1995) sollte DNA als Rezeptor eingesetzt werden. (In einer Arbeit von Polzius (1995) ist Biotin (244 g/mol) indirekt mit einem Gitterkoppler bestimmt worden, indem die Bindungsabnahme biotinylierter Proteine nach vorheriger Biotininkubation verfolgt worden ist).

Zusammenfassend war in dieser Arbeit festzuhalten, daß der direkte Nachweis von Substanzen mit Molekulargewichten $< 2000 \text{ g/mol}$, beispielhaft gezeigt am DNA-Interkalator Ethidiumbromid, nur in der Nähe der Rezeptor-Sättigungsgrenze der Oberfläche geführt werden konnte. Der Nachweis kleiner Liganden an immobilisierten Rezeptoren ist stark von der Menge an Bindungsstellen an der Oberfläche abhängig gewesen. Gefunden wurde eine statistische Verteilung von einem Molekül Ethidiumbromid pro 3 Basenpaare. Meyer-Almes *et al.* (1993) beschreiben, daß 1.7-2.5 Basen von einem Molekül Interkalator okkupiert werden. Waring (1965) zeigt ein Molekül Ethidiumbromid pro 2 bp bei hoher Interkalatorkonzentration (5 mM), so daß der mit Hilfe des Gitterkopplers ermittelte Wert gut mit den Literaturdaten korreliert.

Piehler (1997) findet zusätzlich, daß die reine Adsorption der Nukleinsäure an den Transducer einen deutlichen Einfluß auf die Affinität der Bindungsstellen hat. Das würde die geringere

Signalerhöhung bei Interkalation in die chromosomale DNA aus Hering (s. Abb. 3.24.) erklären. Die Probe hatte bei weitem die meisten theoretischen Bindungsstellen für einen Interkalator, zeigte im Experiment aber eine analoge Bindungskapazität zur reinen Avidinmatrix. Lediglich die Verweilzeit der Substanz in der DNA war erwartungsgemäß höher als die unspezifische Wechselwirkung auf der Avidinoberfläche.

Um Gitterkoppler zur Untersuchung von Wechselwirkungen von Interkalatoren gewinnbringend einsetzen zu können, wäre eine dreidimensionale DNA-Matrix von großem Vorteil: Gerichtete Immobilisierungsmethoden könnten ein Hydrogel erzeugen, das eine weit größere Menge an Bindungsstellen zur Verfügung stellt. Damit wären Untersuchungen zur Gleichgewichtsbeladung kleiner Substanzen möglich, ohne daß die Sonden in maximaler Beladung auf der Oberfläche immobilisiert werden müßte (Piehler, 1997).

Direktsynthese von Oligonukleotiden an Lichtwellenleiter

Proteinvermittelte Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Lichtwellenleiter kann vielfältige Nachteile haben. So könnten die untersuchten Proben mit der Proteinmatrix unspezifisch wechselwirken oder die Regenerierungsschritte zur Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindung der DNA könnten statt dessen auch das Protein abspülen bzw. denaturieren.

Um alternative Kopplungsmethoden zu untersuchen, wurde versucht, die Oligonukleotide direkt auf der Oberfläche zu synthetisieren. Verwendet wurde dazu die in Kap. II. 2.1.1.6. beschriebene *Phosphoramiditmethode*, die einen sequenziellen Aufbau eines Polynukleotiden mit hoher Kopplungsausbeute erlaubt. Der Standardprozeß der Oligonukleotidsynthese nutzt CPG (*controlled pore glass*) als Trägermaterial, das eine große kopplungsfähige Oberfläche besitzt.

Quantifiziert wird die Ausbeute durch Bestimmung der Abgangsgruppe Dimethoxytrityl (DMT), die als orangefarbiges Produkt spektrophotometrisch nachgewiesen werden kann. Auf planaren Lichtwellenleitern dagegen war die Oberfläche im Vergleich zu den Glaspartikeln stark reduziert, so daß die Konzentration des entstehenden DMT die Nachweisgrenze des Photometers unterschritt. Daher mußte man zur eigentlichen Charakterisierung der Kopplungseffizienz des Chips die nachfolgende Hybridisierungsreaktion im Gitterkoppler nutzen.

Ausgewählt wurde für die Synthese auf dem Lichtwellenleiter ein einfaches 12- bzw. 18 mer bestehend aus Cytosinen. Komplexere Sequenzen sollten zunächst vermieden werden, da die

zu erwartende Kopplungseffizienz nicht bekannt war. Reduziert sich diese beispielsweise von theoretisch $> 98 \%$ (wie bei der Standardsynthese üblich) auf 80% Effizienz, ist mit einer Gesamtausbeute an Oligonukleotid von nur 6.9% ($0.80^{12} \times 100$) zu rechnen (Handbuch Gene Assembler, Pharmacia). Eine komplexe Basenabfolge kann dazu führen, daß eine große Anzahl verschiedener Sonden vorliegen. Um das zu verhindern schien eine einfache Sequenz von Cytosinen sehr geeignet für Testuntersuchungen.

Schwierigkeiten bei der Charakterisierung bereitete jedoch der komplementäre Strang aus 22 Guanidinen (Oligo G22), der in Abhängigkeit der Salzkonzentration die in Abb. 3.29. schematisierten Quadruplex-Strukturen ausbilden konnte. Dafür sprach, daß sich diese Aggregate nur bei einer Salzkonzentration $> 400 \text{ mM}$ bilden sollten (Zimmerman *et al.*, 1975). Diese Grenze korrelierte gut mit der Zunahme an Bindung auf der Sensoroberfläche. Wahrscheinlich war eine Ablagerung der Poly-Oligostrukturen auf der Sensoroberfläche.

Bei optimierten Hybridisierungsbedingungen (Salzkonzentration $\leq 400 \text{ mM}$) wurde eine zweifach erhöhte Hybridisierungseffizienz gegenüber den via Biotin-Avidin gebundenen Sonden gefunden. Die direkte Synthese an Chipoberflächen ist daher eine gute Alternative zu anderen Methoden, die jedoch aufgrund entscheidender Schwachpunkte kritisch betrachtet werden muß: So kann, wie oben erwähnt, die Syntheseeffizienz nur sehr ungenügend kontrolliert werden. Ohne aussagekräftige Sequenzanalytik des auf der Oberfläche synthetisierten Stranges (z. B. durch MALDI-TOF, s. O'Donnell-Maloney *et al.*, 1996) wäre die Direktsynthesemethode zur Bindung (biotinylierter) presynthetisierter Oligos nicht konkurrenzfähig.

Maskos *et al.* (1992) gelingt die Quantifizierung der Synthese von Oligonukleotiden an planaren Glasoberflächen, da sie eine im Vergleich zu der Fließzelle der Gitterkopplerchips ca. 16-fach größere Fläche nutzen. Sie beschreiben eine CPG-analoge Beladungsdichte von 0.11 pmol/mm^2 . Cohen *et al.* (1997) demonstriert sogar eine um den Faktor 1.5 höhere Dichte an Oligonukleotiden als in der Arbeit von Maskos bei direkter Nutzung der Hydroxylgruppen auf einem Glaträger.

3. Messungen am BIAcore

Nutzung des BIAcore-Geräts zum Nachweis von Nukleinsäurewechselwirkungen

Im Rahmen der Untersuchungen mit dem BIAcore sollten nach der Immobilisierung einer Sonden-Sequenz auf die Sensoroberfläche verschiedene Einflüsse auf das Sensorsignal wie Länge, Sequenz bzw. Konzentration der Probe charakterisiert werden.

Immobilisiert wurden Sonden-Oligonukleotide auf die Sensoroberfläche mit Hilfe des Affinitätspaares Avidin-Biotin. Die Anlagerung von Avidin ($0.18 \pm 0.009 \text{ pmol/mm}^2$) war mit Literaturwerten gut vergleichbar. So beschreibt Bier (1997) eine ähnliche Varianz in der Avidinimmobilisierung in Abhängigkeit des benutzten Chips. Watts *et al.* (1995) fanden eine Beladung von 0.1 pmol/mm^2 , während Nilsson *et al.* (1995) maximal 0.16 pmol/mm^2 Avidin anlagerten.

Verwendete man eine biotinylierte Dextranmatrix, so zeigte sich eine niedrigere Proteinanlagerung im Vergleich zu anderen Methoden sowie kaum Bindung des biotinylierten Oligonukleotids. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß die meisten Bindungstaschen des Avidins durch Reaktion mit den oberflächengebundenen Molekülen abgesättigt waren.

Bindung von Sonden auf die Sensoroberfläche

Die erreichten Dichten an Sonden-Oligonukleotiden auf der Sensoroberflächen schwankten in Abhängigkeit der Streptavidinbeladung zwischen $1 - 3.2 \text{ ng/mm}^2$ (entspricht $1.04 - 3.3 \cdot 10^{11} \text{ Moleküle/mm}^2$). Persson *et al.* (1997) erhalten für die Bindung von biotinylierten 25-meren an einen Streptavidinchip eine ähnliche Anlagerung von $1 - 1.5 \text{ ng/mm}^2$.

Jordan *et al.* (1997) beschreiben die direkte Kopplung von Sonden-Oligonukleotiden an Gold über bifunktionelle Crosslinker (SSMCC): Die Methode liefert eine Oberflächendichte von $3 \cdot 10^9 \text{ Moleküle/mm}^2$. Die Immobilisierung an die Carboxydextran-modifizierten BIAcore-Chips verlief daher deutlich effizienter, wobei man die potentielle Bindungskapazität von 4 biotinylierten Molekülen pro Streptavidinmolekül als Ursache vermuten kann.

Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche

In dieser Arbeit gelang die Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche durch Einsatz von 50 mM NaOH gut und effektiv, wobei jedoch ein Einfluß der Natronlauge auf die Hybridisierungseffektivität deutlich wurde. Die Ursache der Reduktion könnte in einem Abspülen der biotinylierten Sonden von der Oberfläche begründet liegen. Sollte die Basislinienabnahme nämlich durch die Entfernung von oberflächengebundenen Sonden-Moleküle bedingt sein, hätte dies die beobachtete Signalreduktion für die Hybridisierung zur Folge. Bier (1997) beschreibt den gleichen Effekt bedingt durch die Regenerierungsschritte: Der Autor beobachtet, daß in einer nachgeschalteten zweiten, nur mit Streptavidin beschichteten Oberfläche das Signal in Verlauf der Regenerierungsschritte zunahm. Diesen Effekt begründet er mit einer Auswaschung der biotinylierten Sonden, die jedoch auf der zweiten Fließzelle wieder binden. Er beschreibt jedoch auch, daß die Nachlieferung

biotinylierter Sonden das Hybridisierungssignal nur auf lediglich 80 % ansteigen ließ, so daß das Ausspülen nur *eine* Ursache der Signalabnahme sein kann.

Eine weitere Ursache für die abnehmende Hybridisierungseffektivität könnte daher die basen-induzierte Hydrolyse der Amidbindung des Avidins an die Dextranmatrix sein. Challis *et al.* (1970) beschreiben den Prozeß als langsam, aber irreversibel, so daß durch häufige Regenerierungsschritte die Menge an oberflächengebundenem Avidin reduziert wird. Die Hydrolyse kann als Modell für die Beschreibung Biers dienen, daß selbst die Nachlieferung an biotinylierter Sonde das Signal der Hybridisierung nicht erhöht.

Abschließend bemerkt sei Persson *et al.* (1997), die zur Regenerierung der Sensoroberfläche einen pH-Shift mittels 1 mM HCl nutzen, jedoch nicht die Effizienz der Methode benennen.

Längen- und Konzentrationsabhängigkeit des Sensorsignals

Eine Anlagerung von ca. 70 pg (1.2 fmol)/mm² konnte für ein 18-mer bei einer Probenkonzentration von 50 nM als signifikantes Signal gemessen werden. In Abhängigkeit der Probenlänge können diese unteren Nachweisgrenzen variieren, so daß für die Hybridisierung eines kurzen 8-mers eine Probenkonzentration von 1 µM eingesetzt werden mußte, um ein signifikantes Signal zu erzeugen.

Die Hybridisierung von Einzelsträngen ist eine Reaktion, die neben Proben- und Salzkonzentration auch von der Temperatur und anderen Faktoren abhängt, so daß ein Vergleich mit Literaturdaten häufig erschwert wird, da selten alle Randbedingungen übereinstimmen. Um die erzielten Ergebnisse trotzdem einzuordnen, sollen einige Ergebnisse herangezogen werden: Pollard-Knight *et al.* z. B. beschreiben 1990 als eine der ersten Gruppen und unter Verwendung eines Prismenkopplers (Resonant Mirror) die Untersuchung von Oligonukleotidwechselwirkungen und erhielten für die Hybridisierung eines großen 97-mer Segmentes ein ähnliches Detektionslimit von 1 fmol/mm².

Persson *et al.* (1995) erreichten beim Nachweis eines 8-mers mit Hilfe eines BIAcore-Gerätes ein Detektionslimit von 31 nM, während für ein 8-mer in dieser Arbeit ein Limit von 1 µM festgestellt wurde. Allerdings wird mit einem 0.5 M NaCl enthaltenen Puffer bei 10-15°C gearbeitet, so daß dadurch die Nachweisgrenze drastisch gesenkt werden konnte. Die Autoren erzielen damit eine Hybridisierungsrate von ca. 80 %, während bei den Bedingungen in dieser Arbeit ($T_{Hyb} = 28^{\circ}\text{C}$) lediglich ca. 2% hybridisiert waren.

Einfluß der Salzkonzentration auf die Hybridisierung

Der Einfluß der Salzkonzentration auf die Hybridisierung zeigte einen eindeutigen Verlauf: Während die Abwesenheit von Na^+ -Ionen bei den vermessenen Proben keine Hybridisierung zeigte, wurden die Abstoßungskräfte der wechselwirkenden Einzelstränge durch zunehmende Salzkonzentration immer besser kompensiert. Die Folge war eine bessere Hybridisierungseffektivität, die ihren Ausdruck in der Kinetik der Reaktion und der Hybridisierungsrate fand.

Vergleich Gitterkoppler und BIAcore

Für einen Vergleich zwischen beiden Systemen ist wichtig festzuhalten, daß neben den physikalisch ähnlichen Detektionsprinzipien die Sensoroberflächen unterschiedlich sind:

Der Gitterkoppler besitzt eine *planare Oberfläche*, die eine zweidimensionale Anlagerung des Avidins ermöglicht. BIAcore-Chips dagegen besitzen eine *dreidimensionale Dextranmatrix*, die eine höhere Dichte an Proteinbeladung ermöglichen. So berechnen Williams *et al.* (1994) für einen Monolayer Streptavidin 3.5 ng/mm^2 , während Clerc *et al.* (1997) aus Messungen des effektiven Brechungsindex eine Beladung von 2.5 ng/mm^2 für eine Monoschicht ableitet. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der durchschnittlichen Avidinanlagerung an die BIAcore-Chips (ca. 12 ng/mm^2) zeigt eine um den Faktor 3-5 höhere Konzentration an Protein.

Als Konsequenz der höheren Beladung mit Avidin, ist beim BIAcore daher auch die Konzentration an gebundener Sonde entsprechend höher.

Konsequenzen hatte die unterschiedliche Oberfläche auch in Hinblick auf die Bindung der biotinylierten Sonde, wenn Avidin über Biotin-Moleküle an den Träger immobilisiert wurde: Bei Verwendung der BIAcore-Chips wurde das Protein auf eine Dextranmatrix fixiert, wo kovalent gebundene Biotinmoleküle in einer dreidimensionalen Schicht angeordnet waren. Somit konnten vermutlich leicht sämtliche Bindungstaschen erreicht und abgesättigt werden.

Die Folge war die beobachtete geringe Menge an biotinylierten Sonden, die an ein derart immobilisiertes Protein binden konnten.

Am Gitterkoppler wurde dagegen beobachtet, daß ein über Biotin verbrücktes Avidin durchaus in der Lage war, biotinylierte Moleküle zu binden. Jedoch lag hier das Protein auf einer planaren Schicht immobilisiert vor, so daß man davon ausgehen konnte, daß die oberflächenabgewandten Proteinbindungstaschen nicht mit Biotin abgesättigt waren.

Bei Hybridisierungsreaktionen der Sonde mit verschiedenen langen Standard-Oligonukleotiden konnten beide Geräte die Anlagerung eines 12-mers, nicht jedoch die eines kurzen 8-mers detektieren. Bei der Abhängigkeit der Konzentration vom Sensorsignal zeigte ein 18-mer am BIAcore bereits ab 50 nM (3 pmol aufgetragen) ein signifikantes Signal, während am Gitterkoppler das gleiche Oligonukleotid erst bei 250 nM (50 pmol aufgetragen) nachgewiesen werden konnte. Selbst höhere Salzkonzentrationen konnten beim Gitterkoppler für das 18-mer keine ähnlich niedrige Nachweisgrenze bewirken.

Wichtige Ursache der höheren Empfindlichkeit ist die oben erwähnte größere Dichte an Sonde pro mm²-Sensoroberfläche.

4. Applikation I: Spezifischer Nachweis des Bakteriums *Escherichia coli* DH5 α

Direkter Nachweis von Plasmiden und PCR-Produkten mit Hilfe optischer Detektoren

Eine direkte Hybridisierung eines vollständigen Plasmids konnte am BIAcore-Gerät nicht verfolgt werden. Wahrscheinliche Ursache war die deutlich verlangsamte Hybridisierungskinetik, die neben der Konzentration stark von der *Länge der Probe* abhängt. Das Plasmid pUC 19 hatte eine Länge von 2686 bp, war u. U. zusätzlich spiralisiert, so daß eine gegenüber kurzen Oligonukleotiden deutlich höhere *Halbwertszeit der Hybridisierung* berechnet wurde.

Die Verwendung des gesamten aufgereinigten pUC 19 (1.17 mg entspricht ca. 0.7 nmol Nukleinsäure) hätte nach Gleichung (2) immer noch eine *Halbwertszeit der Hybridisierung* von $t_{1/2} \approx 40$ h für die Festphasenreaktion zur Folge (verglichen mit 3.5 h für ein 20-mer), so daß bei einer mittleren Verweilzeit von 2 bis 60 min auf der Sensoroberfläche ein zu geringer Bruchteil der Plasmide hybridisiert war, um ein Sensorsignal hervorzurufen.

Ein weiterer Grund für mangelnde Hybridisierung am optischen Detektor könnte die Konkurrenz um Hybridisierungsstellen sein. Zwar wurde das ringförmige DNA-Stück vor der Hybridisierung auf dem Sensor denaturiert, jedoch war nicht davon auszugehen, daß sich die spiralisierten Doppelstränge vollständig voneinander lösen (Kimoto *et al.*, 1996). In der Folge rehybridisieren die Plasmidstränge wieder miteinander, besonders bevorteilt durch die räumliche Nähe der u. U. nur partiell getrennten Stränge.

Nicolini *et al.* (1997) verwendet dagegen eine umgekehrte Variante, bei der ein Schwingquarz als Transducer mit einem Plasmid als erkennende Sequenz beschichtet ist und an die kleinere

Fragmente hybridisieren können. Diese Methode, dem Southern-Blot entsprechend, zeigen effektive Hybridisierung an der Sonde

Der Nachweis von Produkten der Polymerasen Kettenreaktion mit Hilfe optischer Sensoren verlief effektiv bei Durchführung einer *asymmetrisch* geführten Reaktion. Zu diskutieren ist, warum sich das doppelsträngige Amplikon nicht hybridisieren ließ. Wie in Kapitel III. 4.2. beschrieben, war die Zeitspanne zwischen Denaturierung des PCR-Produkts und Erreichen der Sensoroberfläche mit ca. 5-10 min gering. Eine Rehybridisierung sollte zusätzlich durch schnelle Lagerung auf Eis vermindert werden. Wetmur *et al.* (1968) untersuchen die Kinetik der Renaturierung von DNA in Lösung, aus deren Messungen sich für das 150 bp-Amplikon bei einer Konzentration von 1 μ M eine *Halbwertszeit der Hybridisierung* von < 20 s ergibt. Die schnelle Rückreaktion der beiden vollständig denaturierten Stränge macht deutlich, warum für das verwendete Assayformat zum spezifischen Nachweis von bakteriellen DNA-Sequenzen die Nutzung von Einzelsträngen essentiell war: Nach kürzester Zeit waren die Stränge teilweise rehybridisiert und damit unzugänglich für die Sonden-Moleküle.

In der Fachliteratur wurden bisher einige Ansätze beschrieben, bei denen für Hybridisierungsassays asymmetrische PCR-Produkte gegenüber symmetrischer PCR bevorzugt wurden. So synthetisiert Kai *et al.* (1999) und Sawata *et al.* (1997) mit der PCR zwei komplementäre Stränge, die jedoch unterschiedlich lang sind und ein kurzes, einzelsträngiges Segment am Ende enthalten, welches zur Hybridisierung benutzt wird. Die Autoren stellen eine effektivere Hybridisierung und höhere Stabilität ihres asymmetrischen Produktes im Vergleich zu Einzelsträngen fest. Diese könnten, besonders bei größerer Länge der Amplikons, intramolekular hybridisieren und damit in Konkurrenz zur Oberflächenhybridisierung treten.

Bianchi *et al.* (1997) setzen zum Nachweis von HIV-1 asymmetrische PCR und ein BIAcore-Gerät ein.

Strachan *et al.* (1995) erzeugten einzelsträngige PCR-Produkte, indem sie ein symmetrisches Produkt, das Biotin-markiert war, auf Streptavidinbeads immobilisierten und durch Erhitzen auf 98°C gezielt einen Strang erhielten, der anschließend an ein kurzes Sonden-Oligonukleotid fixiert auf einem optischen Detektor hybridisieren konnte. Der Nachweis erfolgte über ein Fluoreszenzlabel. O'Meara *et al.* (1997) wählen eine identische Methode, um einzelsträngige PCR-Produkte zu bekommen, die mit spezifischen Oligonukleotiden am BIAcore hybridisiert und untersucht wurden.

Aber auch Methoden die symmetrische Reaktionsprodukte benutzen werden in der aktuellen Literatur für den Nachweis von PCR-Verbindungen mit Hilfe optischer Detektoren beschrieben. Dabei wurden optische Fasern eingesetzt, die biotinylierte PCR-Produkte binden konnten (Graham *et al.*, 1992). Eine anschließende Denaturierung erzeugt einzelsträngige DNA-Moleküle auf der Oberfläche, die durch die Hybridisierung mit Fluorophor-markierter Sonde nachweisbar waren. Somit haben die Autoren das Problem der vorzeitigen Rehybridisierung der Amplikons auf anderem Weg umgangen.

Abschließend bleibt zu erwähnen, daß der erfolgreiche direkte Einsatz von Bakterien in die PCR in der aktuellen Literatur bereits an einigen Beispielen bestätigt wurde. So detektieren Rijpens *et al.* (1999) *Salmonella* durch den Einsatz von hitzedenaturiertem Zelllysat und unter Verzicht auf weitere Nukleinsäureaufreinigung, während Ogunjimi *et al.* (1999) an Magnetpartikel gebundene *E. coli*-Zellen nachweisen.

Allerdings bleibt anzumerken, daß es sich bei der PCR nicht nur um eine hochempfindliche, sondern auch um eine sehr störanfällige Reaktion handelt (Newton *et al.*, 1997). Die Polymerase kann durch eine Vielzahl von Inhibitoren in der Probe gehemmt werden, so daß man häufig den Einfluß von Zellbestandteilen nicht im voraus abschätzen kann. Zur Charakterisierung des Amplikons war daher neben der Länge auch ein Southern-Blot mit spezifischer Sondenhybridisierung notwendig, um gesicherte Aussagen über das PCR-Produkt machen zu können.

Quantitative PCR mit Hilfe optischer Detektoren

Die Quantifizierung von Ausgangskopien für die PCR wurde in dieser Arbeit nicht angestrebt, soll aber trotzdem kurz diskutiert werden. In vielen Bereichen der Diagnostik ist nicht nur die Information über Anwesenheit einer bestimmten Sequenz wichtig, auch Aussagen über die Menge des Templates besitzt Relevanz (z. B. HIV-Infektionen). Daher stellt sich die Frage, ob die optischen Biosensor-Systeme die Anforderungen einer Quantifizierbarkeit erfüllen könnten.

Wie in Kapitel I. 5.1.2. erwähnt, steigt die Zunahme der Produktbildung bei der symmetrischen PCR exponentiell, während die asymmetrische PCR einen linearen Verlauf nimmt. Legt man die Zwei-Stufen-Reaktion zugrunde, bei der erst eine symmetrische PCR durchgeführt wurde, um eine geringe Menge des Produktes in die nachfolgende asymmetrische PCR einzusetzen, dann wird leicht die Komplexität dieses Ansatzes deutlich. Durch den linearen Verlauf der zweiten Stufe der Reaktion, der asymmetrischen PCR, wäre

die Ausgangskonzentration der symmetrischen Probe mit Kenntnis der Zyklenzahl theoretisch leicht bestimmbar. Aus dieser bestimmten Konzentration läßt sich jedoch nur unter Beachtung enger Randbedingungen die Ursprungsmenge des Templates berechnen. Ursache dafür ist der nicht einheitliche Verlauf der symmetrischen PCR, die erst exponentiell verläuft, dann aufgrund verschiedenster Einflüsse abflacht. Daher wäre eine solche Zwei-Stufen-Reaktion nicht brauchbar zur Bestimmung der Ursprungs-Templatezahl.

Denkbar wäre dagegen eine symmetrische PCR, die mit weniger als 20 Zyklen durchgeführt wird, da die Amplifikation in diesem Bereich noch exponentiell verläuft (Newton *et. al.*, 1997). Ein biotinylierter Primer dient zur Bindung des Produkts an eine Avidin-beschichtete Oberfläche (z. B. Magnetbeads, s. Strachan *et al.* (1995)), so daß durch eine nachfolgende Denaturierung ein Einzelstrang erhalten wird, der hybridisiert werden kann. Die Durchführung von PCR-Standardreihen mit bekannten Mengen an Ursprungs-Template dienten als Vergleich zur Einordnung des Sensorsignals, das durch die Hybridisierung der unbekannten Probe erzeugt wird.

Modernen Thermocyclern, wie der ABI PRISMTM 7700 von Perkin-Elmer (Norwalk, USA) oder dem LightCyclerTM von Roche Molecular Biochemicals (Penzberg) gelingt die Amplifikation eines Templates in 30 Zyklen in weniger als 30 min. Wichtiger noch als der geringe Zeitbedarf ist bei diesen Geräten die Möglichkeit der direkten Verfolgbarkeit des PCR-Ablaufs durch die Verwendung Fluoreszenz-markierter Primer.

Mit den angesprochenen Geräten ist eine Quantifizierung von DNA-Templates unbekannter Konzentration möglich, ohne daß Standardreihen zur Anwendung kommen müßten. Außerdem ist der Zeit- und „Hands-on“-Bedarf wesentlich geringer als für die in dieser Arbeit verwendeten optischen Detektoren, so daß diese in Zukunft für die Entwicklung der quantitative PCR keinen großen Beitrag leisten dürften.

5. Applikation II: RNA-Analytik

Einsatz von Magnetpartikeln in der RNA-Aufreinigung:

Vergleich der Kopplungsmethoden

Zwei verschiedene Kopplungsmethoden, Avidin-Biotin-vermittelt und Direktkopplung über das Carbodiimid EDC für Sonden an Magnetbeads wurden getestet. Dabei zeigte sich eine

höhere Hybridisierungseffektivität an Magnetbeads, deren Sonden-Oligonukleotide über Avidin-Biotin immobilisiert waren.

Mögliche Ursache für die höhere Hybridisierungsrate an Avidin-beschichteten Beads könnte, neben der höheren Beladungsdichte an Oligonukleotiden, eine schlechtere Zugänglichkeit der gebundenen Nukleinsäuremoleküle bei Direktkopplung sein. Da die Carbodiimid-immobilisierungsmethode eine spacerlose Bindung des Oligonukleotids auf die Oberfläche zur Folge hat, war dadurch die Hybridisierung u. U. sterisch behindert. Shchepinov (1997) beschreibt deshalb für die direkte Kopplung von Oligonukleotiden an Festphasen eine für die Hybridisierung optimale Spacerlänge von 40 bis 60 Atomen; Maskos (1992) benutzt einen 45 Å langen Spacer, um die Effektivität der Affinitätsreaktion zu steigern. Joos *et al.* (1997) koppelt 15 Nukleotide als von optimierten Abstandshalter, während Guo *et al.* (1994) die Duplexbildung in der direkten Nähe der Oberfläche als destabilisiert beschreibt. Avidin dagegen vergrößerte den Abstand zur Oberfläche, so daß direkte Einflüsse weites gehend vermieden wurden.

Weiterhin waren zwei Wechselwirkungen des Nukleinsäurerückrats mit der Oberfläche möglich, die die Hybridisierung beeinflussen können :

Erstens können nicht nur die endständigen 3'-Phosphatgruppen mit der Oberfläche reagieren, sondern auch Phosphatbrücken innerhalb der Nukleinsäure, so daß die Hybridisierungskinetik an dem Molekül beeinträchtigt sein könnte.

Zweitens sind Coulomb'sche Wechselwirkungen zwischen freien Aminogruppen auf dem Träger und der Nukleinsäure in der Lage, die gebundenen Oligonukleotide zusätzlich zu fixieren. Gingeras *et al.* (1987) empfahl, mit Prehybridisierungspuffer eine parallele Ausrichtung der Probe zur Oberfläche aufgrund der erwähnten Wechselwirkungen zu verhindern. Das Coating mit Makromolekülen, die in der Pufferlösung enthalten sind, verhindert nicht nur die unspezifische Bindung von Proben-Oligonukleotiden, sondern unterdrückt zugleich die für die Hybridisierung ungünstige Adsorption der Sonden auf der Oberfläche.

Ein Vergleich von Magnetbeads mit APTS-silanisierten CPG (*controlled pore glass*), bei dem radioaktives Oligonukleotid direkt gekoppelt wurde, fiel aufgrund der höheren Oberfläche deutlich zugunsten der Magnetpartikel aus. Diese besitzen einen Partikeldurchmesser von 0.5-1.5 µm, wobei das CPG einen um den Faktor 100 größeren Durchmesser hat. CPG besitzt zwar oberflächenvergrößernde Poren, die ebenso zur Nukleinsäurekopplung zur Verfügung standen, dennoch war die Bindungskapazität der Magnetpartikel um den Faktor 3-4 größer.

Hybridisierungsreaktionen an Magnetpartikeln

Lund *et al.* (1988) haben festgestellt, daß die Hybridisierungskinetik für kurze Oligonukleotide an 4.5 µm Magnetbeads ähnlich verläuft wie in Lösung. Damit kann man für ein eingesetztes 18-mer mittels Gleichung (2) die benötigte Zeit zur Hybridisierung der Hälfte der zur Verfügung stehenden Proben auf ca. 84 s abschätzen (Randbedingungen: $[0.1\mu\text{M}]$, $T_{\text{Hyb}} = T_{\text{m}} - 25^\circ\text{C}$). Trotz der theoretisch berechneten geringen Zeiten wurden Inkubationszeiten von 1h bis ü. N. gewählt. Daher wurde davon ausgegangen, daß sich die Reaktion im Gleichgewicht befand, wie auch mit der in Abb. 5.10. gezeigten Messung demonstriert wurde.

Wichtig für die Hybridisierungsreaktionen war der Einfluß kopplungsfähiger Aminogruppen, wenn man betrachtet, daß 1 mg Magnetbeads eine Konzentration von 250 nmol Aminogruppen zur Verfügung stellen (laut Herstellerangaben). Bei der Kopplung von 5.8 – 12.6 pmol Oligonukleotid (s. Tab. 5.2.) wurden jedoch lediglich ca. 2-5% der funktionellen Gruppen genutzt. Die verbleibenden Aminogruppen stellten daher aufgrund ihrer positiven Ladung unter Hybridisierungsbedingungen ein Potential für unspezifische Bindungen negativ geladener Nukleinsäuren dar (Lund *et al.*, 1998), weshalb vor dem Einsatz in Hybridisierungsassays eine Prehybridisierung mit absättigenden Substanzen notwendig war.

Hybridisierung von 5.8S rRNA an Magnetpartikel

Die Versuche der Isolierung und Aufreinigung der ribosomalen RNA mit Hilfe von Magnetpartikeln waren wenig erfolgreich. Mögliche Ursache der mangelnden Hybridisierungseffektivität könnte die schnelle Rückfaltung der 5.8S rRNA sein, die mit der Bindung an die Magnetpartikel kompetiert. rRNA hat in Ribosomen eine *strukturenbildende Funktion*, so daß für das Molekül eine stabile Hybridisierung essentiell ist. Die intrinsische Stabilität der Nukleinsäure, die ursächlich in der Sekundärstruktur (Kap. I. 4.1.) begründet liegt, könnte die Bindung an das gewählte Sonden-Oligonukleotid verhindern.

Bentley *et al.* beschreiben 1995 ein ähnliches Ergebnis für den Versuch einer 16S rRNA-Isolation mit Hilfe von Magnetpartikeln. Experimente, die eine Diskriminierung verschiedener *Streptococcus*-Stämme aufgrund variabler 16S rRNA-Sequenz ermöglichen sollten, zeigen einen starken Einfluß der Sekundärstruktur auf die Hybridisierungseffektivität. Die Wahl einer anderen Sonde, die auch im rückgefalteten Zustand der ribosomalen RNA binden kann, würde u. U. eine effektive Aufreinigung ermöglichen.

Abschließend muß diskutiert werden, warum die Sonde RNA3 an geblottete 5.8S rRNA band, jedoch nicht im Magnetpartikel-Assay. Ein entscheidender Unterschied war das Assayformat, bei dem einmal die rRNA denaturiert und fixiert auf dem Blot vorlag, während sich die Nukleinsäure im Fall des Magnetpartikelassays frei in Lösung befand.

Bei der Northern-Blot-Analyse wurde die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, so daß mittels der UV-aktivierbaren kopplungsfähigen Gruppen auf der Nylonmembran auch weitgehend einzelsträngige rRNA fixiert worden ist, die der Hybridisierung zugänglich war. Ein weiterer Vorteil war die überschüssige Sonde in der Lösung, die beim Northern-Blot eingesetzt wurde.

Im Magnetpartikel-Assay dagegen war die Sonde und ihre Zugänglichkeit ein limitierender Faktor der Reaktion. Das kurze Oligonukleotid war hier immobilisiert und die Probe, wie oben erwähnt, frei in der Lösung vorhanden.

Desweiteren muß für die Magnetpartikelassay festgehalten werden, daß Auswaschungseffekte ein große Fehlerquelle darstellen. Beim Einsatz von nur 0.15 bis 1 mg Partikel war bei den einzelnen Waschschritten das Risiko einer Austragung groß. Blieben nur wenige Beads an der Pipettenspitze adsorptiv kleben, so waren entscheidende Abweichungen unvermeidlich, so daß mit größter Vorsicht gearbeitet werden mußte.

Genexpressionsanalytik mit optischen Biosensoren

Während einer *Pichia Pastoris*-Fermentation sollte mit Hilfe des optischen Biosensors der Verlauf der gesamten mRNA bestimmt werden. Informationen über absolute Menge wären über Standardreihen zugänglich, jedoch waren hier nur die Verhältnisse der mRNAs zu verschiedenen Wachstumsstadien interessant.

Optische Biosensoren, insbesondere das BIAcore, wurden bisher hauptsächlich zur Charakterisierung von Expressionsprodukten eingesetzt. Statt auf der Ebene der mRNA zu untersuchen, haben Gill *et al.* (1998) Bioprozeßanalytik mit optischen Biosensoren durchgeführt, indem sie „at-line“ die Produktion rekombinant hergestellten Lysozyms aus *E. coli* verfolgten. Alfthan (1998) beschreibt die Expressionskontrolle von Antikörpern mit dem BIAcore, während Lindner *et al.* (1997) ebenso Antikörperfragmente aus dem *E. coli* Expressionssystem untersuchen. Zusammenfassend war ein deutlicher Schwerpunkt auf der Genexpressionsanalytik auf der *Ebene der Genprodukte*, den Proteinen zu erkennen.

Expressionsanalytik auf der *mRNA-Ebene* wurde in den Jahren vermehrt auf Mikrochips durchgeführt, die mit hochdichten Oligonukleotidarrays belegt sind (Lipshutz *et al.*, 1999).

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz weicht also von dem Ansatz der Verfolgung der Expression auf Proteinebene ab; die Effektivität soll in Folge diskutiert werden:

Nachweis von Gesamt-mRNA mit Hilfe optischer Biosensoren

Die Hybridisierung der Gesamt-mRNA konnte erfolgreich mit Hilfe eines 24-mers bestehend aus Thyminresten durchgeführt werden, da alle mRNA-Moleküle eukaryontischer Zellen polyadenyliert vorliegen (Lehninger *et al.*, 1994). Durch Aufkonzentrierung mit Hilfe von Magnetpartikeln konnte 13.5 ng Gesamt-mRNA nachgewiesen werden. Jedoch war auch ohne weitere Aufreinigungsschritte die Bindung der polyadenylierten mRNA an die Sensoroberfläche leicht durchführbar.

Verfolgung der Bildung von mRNA während einer *Pichia Pastoris* –Fermentation

Der Auftrag von 5 µg Total-RNA, die aus geernteten Zellen isoliert wurden, reichte aus, um den Verlauf der mRNA zu charakterisieren. Deutlich zu erkennen war die geringe Konzentration an mRNA am Anfang der Fermentation, die mit der geringen Zelldichte korrelierte. Auch das Stadium des Glycerinmangels nach 20 h Fermentation konnte anhand des abnehmenden Sensorsignals charakterisiert werden.

Die mRNA hoch exprimierter Gene können einen Anteil von 5-10 % an der Gesamt-m-RNA der Zelle haben (Kap. I. 4.1.). Lag das Sensorsignal der polyadenylierten Gesamt-mRNA bei ca. 800 RU, wäre bei einem Anteil der spezifischen Luziferase-mRNA von postulierten 5% das zu erwartende Signal ca. 40 RU. Dieses wäre nur dann signifikant zu detektieren, wenn die unspezifischen Bindungen und das Signal-Rausch-Verhältnis vernachlässigbar gering sind. Mehrere Erklärungsansätze für das Fehlen eines signifikanten Sensorsignals sind denkbar:

- Zu geringe Konzentration der Luziferase-mRNA in der Lösung durch geringes Expressionsniveau. Liegt der Anteil der gesuchten mRNA an der Gesamt-mRNA bei unter 5%, so wäre das zu erwartende Signal zu klein, um klar diskriminiert zu werden.
- Intrinsische Wechselwirkungen der Proben-mRNA erschweren die Hybridisierung an das Sonden-Oligonukleotid: Die mRNA bildet als einzelsträngiges Molekül leicht doppelsträngige Sekundärstrukturen aus, die eine Hybridisierung an eine feste Phase unterbinden würden. Selbst bei Hitze-Denaturierung ist durch die räumliche Nähe der intramolekularen Wechselwirkungen mit einer schnellen Rehybridisierung zu rechnen.

Experimentelle Auswege würde die RT-PCR bieten (s. Kap. I. 5.1.3.), die eine Amplifikation der gesuchten mRNA und anschließende Detektion mit Hilfe des Biosensors erlaubt. Die Vervielfältigung der gesuchten mRNA ist besonders für niedrig exprimierte Gene, die nur wenige mRNA pro Zelle besitzen, essentiell.

Hybridisiert die gesuchte mRNA trotz hoher Konzentration nicht auf der Sensoroberfläche, so kann die Sequenz durch geeignete Computerprogramme auf die mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen analysiert werden. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wäre eine effektive Wahl der Sonde besser möglich.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich optische Biosensoren eignen, um Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren nachweisen zu können. Dabei wurden der *Gitterkoppler*, ein integriert-optischer Detektor, sowie das *BIAcore*-System verwendet. Beide Detektoren nutzen ein sensitives, sog. *evaneszentes Feld*, um Anlagerungen von Molekülen auf der Sensoroberfläche zu verfolgen. Dieses elektromagnetische Feld wird bei beiden Geräten durch optische Anregung induziert.

Wichtig für die Anwendung von Biosensoren ist eine möglichst hohe Dichte von „Erkennungsmolekülen“ auf der Sensoroberfläche. Deshalb wurden die Belegung zu Beginn mit Hilfe eines Atom-Kraftmikroskops (AFM) untersucht. Damit konnte die Dichte des immobilisierten Proteins Avidin charakterisiert, sowie das Anlagerungsverhalten von DNA an verschieden modifizierten Oberflächen untersucht werden.

Um Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuremolekülen mit Hilfe der optischen Biosensoren zu detektieren, wurde ein Reaktionspartner, ein kurzes Oligonukleotid („Sonde“), chemisch oder vermittelt durch das Affinitätspar Avidin-Biotin auf die Oberfläche immobilisiert. War aufgrund übereinstimmender Basenabfolge eine Doppelstrangbildung („Hybridisierung“) zwischen der kurzen Sonde auf dem Sensor und einer Probe möglich, veränderte sich durch die Anlagerung der effektive Brechungsindex auf der Oberfläche. Diese Verschiebung konnte durch die optischen Biosensoren gemessen werden. Beide Sensoren wurden in Hinblick auf Konzentrations- und Längenabhängigkeit der Oligonukleotidprobe charakterisiert. Dabei zeigte sich eine niedrigere Nachweisgrenze beim *BIAcore*, die auf die unterschiedlichen *Oberflächen* der Sensoren zurückzuführen war.

Anhand von zwei Applikationen wurde untersucht, ob die Biosensoren konventionelle Methoden der Molekularbiologie ergänzen bzw. ersetzen können. In der *ersten Anwendung* wurde versucht, ein bakterielles Plasmid anhand einer spezifischen Basenabfolge nachzuweisen. Es zeigte sich, daß bei Verwendung des gesamten Plasmids aufgrund der Komplexität der Probe keine Hybridisierung nachweisbar war. Wurde die gesuchte Sequenz jedoch mit Hilfe einer sog. *asymmetrischen PCR* vervielfältigt, war ein spezifischer Nachweis möglich. Die enzymatisch katalysierte Vervielfältigung (Amplifikation) der Probensequenz war mit Hilfe der optischen Biosensoren verfolgbar. Auch der direkte Einsatz ganzer Bakterien in die PCR erbrachte ein Produkt, das mit einer sensorgebundenen Sonde hybridisierte.

Mit der *zweiten Anwendung* wurde versucht, ribosomale und messenger RNA nachzuweisen. Voruntersuchungen mit Hilfe radioaktiver Sonden ließen Aussagen über Hybridisierungsbedingungen und optimaler Länge der Sonden zu, die auf die optischen Biosensoren übertragen werden konnten. Während einer Hefe-Fermentation zeigte sich, daß die Entwicklung der gesamten mRNA verfolgbar war. Eine spezifische mRNA, die Aufschluß über den Grad der Genexpression eines Zielproteins geben sollte, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, daß sich die optischen Sensoren für Anwendungen wie die Verfolgung von Hybridisierungsreaktionen sehr eigneten. In Kombination mit Amplifikationsreaktionen wie die PCR waren selbst geringste Menge an DNA nachweisbar. Mit diesen grundlegenden Experimenten sind weitergehende Anwendungen, insbesondere auf dem Gebiet der Integration von Amplifikation und optischer Detektion, als sinnvoll zu bewerten.

Abel AP, Weller MG, Duveneck GL, Ehrat M, Widmer HM (1996), Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides, *Anal. Chem.*, Vol. 68, S. 2905-2912.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995), *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim.

Albretsen C, Kalland KH, Haukanes BI, Haverstein LS, Kleppe K (1990), Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate, *Anal. Biochem.*, Vol. 189, S. 40-50.

Alfthan K (1998), Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering, *Biosens.-Bioelectr.*, Vol. 13 (6), S. 653-663.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977), Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylmethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 74, S.5350-5354.

Amasino RM (1986), Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol, *Anal. Biochem.*, Vol. 152, S. 304.

Anderson MLM, Young BD (1985), Quantitative filter hybridization, in: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (Eds.: Hames BD, Higgins SJ), S.73-80, IRL Press, Oxford.

Andres JL, Turkel GJ, Wang JA, Twu NF, Yuan RQ, Lamszus K, Goldberg ID, Rosen EM (1998), Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents, *Oncogene*, Vol. 16 (17), S. 2229-2241.

Atkins PW (1996), *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim.

Baldwin C, Robinson CW (1990), Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* using enzymatic lysis combined with high-pressure homogenization cell disintegration, *Biotechnol. Tech.*, Vol.96 (4), S. 329-334.

Bednar J, Furrer P, Stasiak A, Dubochet J, Engelman EH, Bates AD (1994), The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure *in vivo*, *J. Mol. Biol.* Vol. 235, S. 825-847.

Beier M, Hohheisel JD (1999), Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips, *Nucleic Acids Research*, Vol. 27 (9), S. 1970-1977.

Bentley RW, Leigh (1995), Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 33, S. 1296-1301.

Berk AJ, Sharp PA (1977), Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids, *Cell*, Vol. 12, S. 721-732.

- Bezanilla M, Manne S, Laney DE, Lyubchenko YL, Hansma HG (1995), Adsorption of DNA to Mica, silylated Mica, and minerals: characterization by atomic force microscopy, *Langmuir*, Vol. 11, S. 655-659.
- Bianchi N, Rutigliano C, Tomasetti M, Feriotto G, Zorzato F, Gambari R (1997), Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction, *Clin. Diagn. Virol.*, Vol. 8 (3), S.199-208.
- Bier FF, Kleinjung F, Scheller FW (1996a), Real-time measurement of nucleic-acid hybridization using evanescent-wave sensors: steps towards the genosensor, *Sens. Act. B*, eingereicht (publiziert jedoch in Bier (1997))
- Bier FF, Scheller FW (1996b), Label-free observation of DNA-hybridization and endonuclease activity on a wave guide surface using a grating coupler, *Biosens. Bioelectr.*, Vol. 11, S. 669-674.
- Bier FF (1997), Biomolekulare Erkennung und Signaltransduktion in Affinitätssensoren, Habilitationsschrift, Universität Potsdam.
- Bier FF, Fürste JP (1997), Nucleic acid based sensors, in: *Frontiers in Biosensorics I*, Fundamental Aspects, Eds.: Scheller FW, Schubert F und Fedrowitz J, Birkhäuser Verlag Basel, Schweiz.
- Bilitewski U, Kuhlmeier D (1999), Detecting DNA mutation by amplifying using polymerase reaction, Patent, WO 9853098, 26.11.98.
- Binnig G, Quate CF, Gerber CH (1986), Atomic force microscopy, *Phys. Rev. Letters*, Vol. 56, S. 930-933.
- Birkenbeil H (1983), Einführung in die praktische Mikrobiologie: mikrobiologische Arbeitsmethoden und Versuche, S. 102-104, Diesterweg/Salle Sauerländer Verlag, Frankfurt/M.
- Birren B, Green ED, Klapholz S, Myers RM, Roskamp J (1997), Genome Analysis : Analyzing DNA, A Laboratory Manual, Vol.1, 1. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Brandenburg A, Gombert A (1993), Grating couplers as chemical sensors: A new optical configuration, *Sens. Act. B*, Vol. 17, S. 35-40.
- Brecht A, Gauglitz G, Reflectometric interference spectroscopy for direct affinity sensing, in : *Frontiers in Biosensorics*, Vol. 2: Applications, Eds.: Scheller FW, Schubert F und Fedrowitz J), Birkhäuser, Basel.
- Bryan RN, Ruth JL, Smith RD, LeBon JM (1986), Diagnosis with clinical samples with synthetic oligonucleotide hybridisation probes, *Microbiology*, S.113, Levine L, Ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Bustamante C, Rivetti C, Keller DJ (1997), Scanning force microscopy under aqueous solutions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol. 7, S. 709-716.

- Cantor CR, Mirzabekov A, Southern EM (1992), Report on the sequencing by hybridization workshop, *Genomics*, Vol. 13 (4), S. 1378-1383.
- Caruso F, Rodda E, Furlong DN, Niikura K, Okahata Y (1997), Quartz crystal microbalance study of DNA immobilized and hybridization for nucleic acid sensor development, *Anal. Chem.*, Vol. 69, S. 2043-2049.
- Caviani Pease A, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA (1994), Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, S. 5022-5026.
- Cleaver OB, Patterson KD, Krieg PA (1996), Isolation of Poly-A⁺ RNA, in : A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis, Edited by Paul A. Krieg, Wiley-Liss, Inc., USA.
- Clerc D, Lukosz W (1997), Direct immunosensing with an integrated-optical output grating coupler, *Sens. Act. B*, Vol. 40, S. 53-58.
- Challis, Challis (1970), The Chemistry of Amides, Ed. Zabicky, Interscience, New York, S. 731-857.
- Chan V, Graves DJ, Fortina P, McKenzie SE (1997), Adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid surfaces, *Langmuir*, Vol. 13, S. 320-329.
- Cheng J, Sheldon EL, Wu I, Uribe A, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O'Connell JP (1998), Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips, *Nature Biotechnol.*, Vol. 16, S. 541-546.
- Cohen G, Deutsch J, Fineberg J, Levine A (1997), Covalent attachment of DNA oligonucleotides to glass, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, S. 911-912.
- Collins ML, Zayati C, Detmer JJ, Daly B, Kolberg JA, Cha TA, Irvine BD, Tucker J, Urdead MS (1995), Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays, *Anal. Biochem.*, Vol. 226, S. 120-129.
- Cruss B (1986), Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G, *Embo J.*, Vol. 5, S. 1567-1575.
- Darling DC, Brickel PM (1996), Nukleinsäureblotting, Reihe Labor im Fokus, 1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
- Davies MJ, Taylor JJ, Sachsiger N, Bruce IJ (1998), Isolation of plasmid DNA using magnetite on a solid-phase adsorbent, *Anal. Biochem.*, Vol. 262, S.92-94.
- Duveneck GL, Pawlak M, Neuschäfer D, Bär E, Budach W, Piele U, Ehrat M (1997), Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides, *Sens. Act. B*, Vol. 38-39, S. 88-95.

- Eckert K (1999), Klonierung und Expressionsversuche zur Produktion von Luziferase in *Pichia Pastoris*, Diplomarbeit, Fachhochschule Bingen, Fachbereich Verfahrenstechnik-Biotechnologie.
- Elferink CJ, Reiners Jr JJ (1996), Quantitative RT-PCR on CYP1A1 heterogeneous nuclear RNA: a surrogate for the in vitro transcription run-on-assay, *BioTechniques*, Vol. 20 (3), S. 470-477.
- Engel A, Gaub HE, Müller DJ (1999), Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules, *Curr. Biol.*, Vol. 9, S. R133-136.
- Fagerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Ronnberg I (1992), Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding-site and concentration analysis, *J. Chromatogr.*, Vol. 597, S. 397-410.
- Ferré F, Pezzoli P, Buxton E, Duffy C, Marchese A, Daigle A (1995), Quantification of RNA targets using the polymerase chain reaction, in : *Molecular Methods for Virus Detection*, Wiedbrauk D, Farkas DH (Eds.), Academic Press, San Diego, Vol. 9, S.193-218.
- Fojta M, Doffkova R, Palacek (1995), Determination of traces of RNA submicrogram amounts of single- or double-stranded DNAs by means of nucleic acids-modified electrode, *Electroanalysis*, Vol. 8 (5), S. 420-426.
- Gannon F (1994), DNA-probes for the identification of microorganism, *J. Ind. Microbiol.*, Vol. 13 (2), S. 71-76.
- Gest, Portig (1991), Integrierte Optik, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Ghosh SS, Musso GF (1987), Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports, *Nucleic Acids Research*, Vol. 15, S. 5353-5372.
- Giessendorf BA, Quint WG, Vandamme P, Van-Belkum A (1996), Generation of DNA-probes for the detection of microorganism by polymerase chain reaction fingerprinting, *Zentralbl. Bakteriol.*, 283 (4), S. 417-430.
- Gill A, Bracewell DG, Maule CH, Lowe PA, Hoare M (1998), Bioprocess monitoring: an optical biosensor for rapid bioproduct analysis, *J. Biotechnol.*, Vol. 65 (1), S. 69-80.
- Gingeras TR, Kwoh DY, Davis GR (1987), Hybridization properties of immobilized nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, Vol. 15, S. 5373-5390.
- Gotoh M, Hasebe M, Ohira T, Hasegawa Y, Shinohara Y, Sota H, Nakao J, Tosu M (1997), Rapid method for detection of point mutations using mismatch binding proteins (MutS) and an optical biosensor, *Genet. Anal.*, Vol. 14, S. 47-50.
- Graham CR, Leslie D, Squirrell DJ (1992), Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 7, S. 487-493.

Green NM (1990), Avidin and Streptavidin, in: Avidin-Biotin technology (Eds.: Wilchek M, Bayer EA), S. 51-67, *Methods in Enzymology*, Vol. 184, Academic Press Inc., San Diego, USA.

Grimont P, Regnault B, Collin M (1999), New oligonucleotide that hybridizes specifically with ribosomal RNA or DNA of *Escherichia coli*, Patent: FR 2766825, 05.02.99.

Günther A (1994), Enzymhemmtests mit immobilisierter Acetylcholinesterase in der Fließinjektionsanalyse zur Bestimmung von Insektiziden in Wasser, Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.

Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM (1994), Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass support, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, S. 5456-5465.

Gyllenstein UB, Erlich HA (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, S. 7652.

Haase B (1996), Gentechnische Herstellung von Antikörpern: Rekombinante Antikörper gegen Cytomegalovirus aus Säuger-, Insekten- und *E.coli*-Zellen, Dissertation, Universität Hannover, Fachbereich Biochemie.

Hacia JG (1999), Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays, *Nature Genet.*, Vol. 21, S. 42-47.

Hafner JH, Cheung CL, Lieber CM (1999), Growth of nanotubes for probe microscopy tips, *Nature*, Vol. 398, S. 761-762.

Handbuch Ultrospec 3000 (UV/VIS-Spectrophotometer), Pharmacia Biotech, Cambridge, England, 1995.

Hansma HG, Vesenka J, Siegerist C, Keldermann G, Morrett H, Sinsheimer RL, Bustamante C, Elings V, Hansma PK (1992), Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the AFM, *Science*, Vol 256, S. 1180-1184.

Hansma HG, Hansma PG (1993), Potential applications of AFM of DNA to the human genome project and DNA sequencing, *Proc. SPIE*, Vol. 1891, S. 66-70.

Hansma HG, Revenko I, Kim K, Laney DE (1996), Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single stranded and triple-stranded nucleic acids, *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, S. 713-720.

Haukanes BI, Kvam C (1993), Application of magnetic beads in bioassays, *Bio/Technology*, Vol. 11, S.60-63.

Healey BG, Matson RS, Walt DR (1997), Fiber optic DNA sensor array capable of detecting point mutations, *Anal. Biochem.*, Vol. 251, S. 270-279.

Heinz WF, Hoh JH (1999), Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the AFM microscope, *Trends Biotechnol.*, Vol. 17, S. 143-150.

- Hengerer B (1993), A rapid procedure for mRNA extraction from a large number of samples involving attachment to an affinity-labeled magnetic bead, *BioTechniques*, Vol. 14 (4), S. 522-524
- Henze B (1999), DNA-Analyse mittels Kapillarelektrophorese am Beispiel des Faktor V Leiden, Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Hermanson GT, Krishna Mallia A, Smith PK (1992), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, Inc., 1. Aufl., London.
- Herne TM, Tarlov MJ (1997), Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 119 (38), S. 8916-8920.
- Heuberger K, Lukosz W (1986), Embossing technique for fabricating surface relief gratings on hard oxide waveguides, *Applied Optics*, Vol. 25, 9, S. 1499-1504.
- Hochstrasser DF (1998), Proteome in perspective, *Clin. Chem. Lab. Med.*, Vol. 36 (11), S.825-836.
- Hodgson J (1998), Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future, *Nature Biotech.*, Vol. 16 (8), S. 725-727.
- Howley PM, Israel MF, Law MF, Martin MA (1979), *J. Biol. Chem.*, Vol. 254, S. 4876.
- Hu J, Wang M, Weier HUG, Frantz P, Kolbe W, Ogletree DF, Salmeron M (1996), Imaging of single extended DNA molecules on flats (Aminopropyl)triethoxysilane-mica by AFM, *Langmuir*, Vol. 12, 7, S. 1697-1700.
- Joos B, Kuster H, Cone R (1997), Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports, *Anal. Biochem.*, Vol. 247, S. 96-101.
- Jordan CE, Frutos AG, Thiel AJ, Corn RM (1997), Surface Plasmon Resonance Imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces, *Anal. Chem.*, Vol 69, S. 4939-4947.
- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979), Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot blot hybridization procedure, *Nucleic Acids Research*, Vol. 7, S.1541-1552.
- Kai E, Sawata S, Ikeburo K, Iida T, Honda T, Karube I (1999), Detection of PCR-products in solution using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.*, Vol. 71(4), S. 796-800.
- Katz SL (1986), The prospects for immunizing against *Shigella* spp. in : New vaccine development: establishing priorities, Vol. 2 (Diseases of importance in developing countries), National Academy Press, Washington D.C., USA.
- Kelley SO, Jackson NM, Hill MG, Barton JK (1997), Electrochemical biosensors based on DNA-modified electrodes, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 214. Meeting, Pt.1, ANYL003.

- Kherterpal I, Mathies RA (1999), Capillary electrophoresis DNA sequencing, *Anal. Chem.*, Vol. 71, S. 31A-37A.
- Kimoto H, Taketo A (1996), Studies on electrontransfer of DNA into *Escherichia coli*: effect of molecular form of DNA, *Biochim. Biophys. Acta-N*, Vol 1307, S.325-330.
- Knapp HF, Wiegrabe W, Heim M, Escherich R, Guckenberger R (1995), Atomic force microscope measurements and manipulation of Langmuir-Blodgett films with modified tips, *Biophys. J.*, Vol. 69 (2), S. 708-715.
- Knippers R (1997), Molekulare Genetik, 7. Aufl. S.22-29, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- Kosseck S, Padeste C, Tiefenauer L X, Siegenthaler H (1998), Localization of individual biomolecules on sensor surfaces, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.13-1, S. 31-43.
- Kretzschmann E, Raether H (1968), Radiative decay of non-radiative surface plasmons by light, *Z. Naturforsch.*, Vol.23a, S.2135.
- Krieg PA (1996), A laboratory guide to RNA, 1. Auflage, Wiley -Liss, Inc., New York, USA.
- Kröger K (1998), Hybridisierungskinetiken von DNA und PNA an Oberflächen, Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Kukanskis K, Elkind J, Melendez J, Murphy T, Miller G, Garner H (1999), Detection of DNA Hybridization using the TISPR-1 surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Biochem.*, Vol. 274, S. 7-17.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE (1996), Use of polymerase chain reaction for *Salmonella* detection, *Lett. Appl. Microbiol.*, Vol. 22, S. 46-51.
- Lawrence CR, Martin AS, Sambles JR (1992), Surface plasmon polariton studies of highly absorbing Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films.*, Vol. 208, S. 269.
- Lee GU, Chrisey LA, Colton RJ (1994), Direct measurements of the forces between complementary strands of DNA, *Science*, Vol. 266, S.771-773.
- LehningerAL, Nelson DL, Cox MM (1994), Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Liang P, Pardee AB (1992), Differential Display fo eukaryontic messengerRNA by means of polymerase chain reaction, *Science*, Vol. 257 (5072), S. 967-971.
- Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993), Distribution and cloning of eukaryontic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization, *Nucleic Acids Research*, Vol. 21 (14), S. 3269-3275.
- Liedberg B, Nylander C, Lundström I (1983), Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators*, Vol. 4, S.299-304.

- Lindner P, Bauer K, Krebba A, Nieba L, Kremmer E, Honegger A, Klinger B, Mcikat R, Plückthun A (1997), Specific detection of His-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions by affinity tail single chain antibody engineering, *BioTechniques*, Vol. 22, S. 140-149.
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999), High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nature Genetics*, Vol. 21, S. 20-24.
- Locascio-Brown L, Plant AL, Horvath V, Durst RA (1990), Liposome flow injection immunoassay: Implications for sensitivity, dynamic range, and antibody regeneration, *Anal. Chem.*, Vol. 62, S. 2587-2593.
- Löfås S, Johnsson B (1990), A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, Vol. 21, S. 1526.
- Lottspeich F, Zorbas H (1998), Bioanalytik, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
- Luke S, Shepelsky M (1998), FISH: recent advances and diagnostic aspects, *Cell Vis.*, Vol. 5 (1), S. 49-53.
- Lukosz W (1991), Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosens. Bioelectr.*, Vol. 6, S. 215-225.
- Lukosz W, Tiefenthaler K (1983), Embossing technique for fabricating optical components in hard inorganic waveguide materials, *Optics letters*, Vol. 8, 10, S. 537-539.
- Lund V, Schmid R, Rickwood D, Hornes E (1988), Assessment of methods for covalent binding of nucleic acids to magnetic beads, Dynabeads, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22 (16), S. 10861-10880.
- Lyubchenko YL, Shlyakhtenko (1997), Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, S. 496-501.
- Lyubchenko YL, Shlyakhtenko L, Harrington R, Oden PM, Lindsay S (1993), Atomic force microscopy of long DNA: Imaging in air and under water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, S. 2137-2140.
- Malmqvist M (1993), Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics, *Current Opinion in Immunology*, Vol. 5, S. 282-286.
- Mani JC, Marchi V, Cucurou C (1994), Effect of HIV-1 peptide presentation on the affinity constants of two monoclonal antibodies determined by BIAcore technology, *Mol. Immun.*, Vol. 31, S. 439-444.
- Manz A (1997), Ultimate speed and sample volumes in electrophoresis, *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 25, S. 278-281.

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1987), *Molecular cloning: A Laboratory manual*, 14. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Martin R (1996), *Elektrophorese von Nukleinsäuren, Reihe Labor im Fokus*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
- Maskos U, Southern E M (1992), Oligonukleotide hybridisations on glass supports : a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised *in situ*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, 7, S. 1679-1684.
- Marrazza G, Chianelle I, Mascini (1999), Disposable DNA electrochemical sensor for habridization detection, *Biosensors & Bioelectr.*, Vol. 14, S. 43-51.
- Marzilli LG (1990), *New J. Chem.*, Vol. 14, S. 409.
- Mazzola LT, Frank CW, Fodor SP, Mosher C, Lartius R, Henderson E (1999), Discrimination of DNA hybridization using chemical force microscopy, *Biophy. J.*, Vol. 76 (6), S. 2922-2933.
- McConaughy BL, Laird CD, McCarthy BJ (1969), Nucleic acid reassociation in formamide, *Biochemistry*, Vol. 8, S. 3289.
- McGall GH, Barone AD, Diggelmann M, Fodor SPA, Gentalen E, Ngo N (1996), The efficiency of light directed synthesis of DNA arrays on glass substrates, *J. Am. Chem. Soc.* , Vol. 119 (22), S. 5081-5090.
- Meinkoth J, Wahl G (1984), Hybridisation of nucleic acids on solid supports, *Anal. Biochem.*, Vol. 138, S. 267.
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR (1984), Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter, *Nucleic Acids Research*, Vol. 12, S. 7035-7056.
- Meyer-Almes FJ, Porschke D (1993), Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium, *Biochemistry*, Vol. 32, S. 4246-4253.
- Millan KM, Mikkelsen SR (1993), Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, Vol. 65, S. 2317-2323.
- Miller CA, Patterson WL, Johnson PK, Swartzell CT, Wogoman F, Albarella JP, Carrico RJ (1988), Detection of bacteria by hybridisation of rRNA with DNA-latex and immunodetection of hybrids, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 26, S. 1271-1276.
- Mollaret HH, Bercovier H, Alonso JM (1979), Summary received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*, *Contrib. Microbiol. Immunol.* Vol. 5, S. 174-184.
- Murray MN, Hansma HG, Bezanilla M, Sano T, Ogletree DF, Kolbe W, Smith CL, Cantor CR, Spengler S, Hansma PK, Salmeron M (1993), Atomic force microscopy of biochemically tagged DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, S.3811-3814.

- Napier ME, Loomis CR, Sistare MF, Kim J, Eckhardt AE, Thorp HH (1997), Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization, *Bioconjug. Chem.*, Vol. 8, S. 906-913.
- Neidle S (1994), DNA structure and recognition, Reihe In focus, 1. Auflage, IRL Press, Oxford, Großbritannien.
- Newton CR, Graham A (1997), PCR, Reihe Labor im Focus, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
- Nicolini C, Erokhin V, Guerzoni S, Ross A, Paschkevitch P (1997), Quartz balance DNA sensor, *Biosens. Bioelectron.* Vol. 12 (7), S. 613-618.
- Nilsson P, Persson B, Uhlén M, Nygren PA (1995), Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology, *Anal. Biochem.*, Vol. 224, S. 400-408.
- Nishimura S, Biggs S, Scales PJ, Healy TH, Tsunematsu K, TW Tateyama (1994), Molecular structure of the cation modified muscovite mica basal plane, *Langmuir*, Vol. 10, S. 4554-4559.
- O'Donnell-Maloney MJ, Smith CL, Cantor CR (1996), *Trends-Biotechnol.*, Vol. 14 (10), S. 401-407.
- Ogunjimi AA, Prabhakara VC (1999), Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7, *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, Vol. 23, S. 213-220.
- Okahata Y, Niikura K, Sugiura Y, Sawada M, Morii T (1998), Kinetic studies of sequence-specific binding of GCN4-bZIP peptides to DNA strands immobilized on a 27-MHz quartz crystall microbalance, *Biochemistry*, Vol. 37, S. 5666-5672.
- O'Meara D, Nilsson P, Nygren PÅ, Uhlén M, Lundeberg J (1997), Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide modules, *Anal. Biochem.*, Vol. 255, S. 195-203.
- Parekh R (1999), Proteomics and molecular medicine, *Nature Biotechnology*, Vol. 17, S. 19-20.
- Partis MD, Griffith DG, Roberts GC, Beechley RB (1983), Crosslinking of protein by ω -maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters, *J. Prot. Chem.* Vol.2/3, S. 263-277.
- Persson B, Stenhag K, Nilsson P, Larsson A, Uhlén M, Nygren PA (1997), Analysis of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance: a means for mutational scanning, *Anal. Biochem.* Vol. 246, S. 34-44.
- Persson B, Nilsson P, Nygren PA, Larsson A, Uhlén M, Malmquist (1995), Affinity measurements of DNA hybridization using 8-mer probes, *Book of abstracts of the 5th european BIA symposium*, Stockholm, 27.-29. September 1995.
- Piehl J (1997), Thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit direkten optischen Transducern, Dissertation, Universität Tübingen.

- Piehlner J, Brecht A, Gauglitz G, Maul C, Grabley S, Zerlin M (1997a), Specific binding of low molecular weight ligands with direct optical detection, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 12 (6), S. 531-538.
- Piehlner J, Brecht A, Gauglitz G, Zerlin M, Maul C, Thiericke R, Grabley S (1997b), Label free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.* Vol. 249, S. 94-102.
- Pietsch K, Waiblinger HU, Brodmann P, Wurz A (1997), *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Vol. 2, S. 35-38.
- Piper A (1998), The dark lady, *TIBS*, Vol. 23 (4), S. 151-154.
- Pirrung MC, Read JL, Fodor SPA, Stryer L (1990), Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding screening thereof, Patent (USA): 5,143,854.
- Piunno PAE, Krull UJ, Hudson RHE, Damha MJ, Cohen H (1995), Fiber-optic DNA sensor for fluorimetric nucleic acid determination, *Anal. Chem.*, Vol. 67, S. 2635-2643.
- Pollard-Knight D, Hawkins E, Yeung D, Pashby DP, Simpson M, McDougall A, Buckle P, Charles SA (1990), Immunoassays and nucleic acid detection with a biosensor based on surface plasmon resonance, *Ann. Biol. clin.*, Vol. 48, S. 642-646.
- Polzius R (1995), Gitterkoppler als direkte biochemische Affinitätssensoren, Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Polzius R, Schneider T, Bier FF, Bilitewski U (1996), Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 11 (5), S. 503-514.
- Polzius R, Diebel E, Bier FF, Bilitewski U (1997), Real-time observation of affinity reactions using grating couplers: determination of the detection limit and calculation of kinetic rate constants, *Anal. Biochem.* Vol. 248, S. 269-276.
- Power DA (1988), Manual of BBL Products and Laboratory Procedures, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville Maryland, USA.
- Raap AK (1998), Advances in fluorescence in situ hybridization, *Mutat. Res.*, Vol. 400, S. 287-298.
- Richardson CC (1981), The Enzymes, Vol. 14, S. 299-314, Academic Press, San Diego.
- Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, De Smedt J, De Zutter L (1999), Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR, *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 46, S. 37-44.
- Rivetti C, Guthold M, Bustamante C (1996), Scanning force microscopy of DNA deposited onto Mica: Equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis, *J. Mol. Biol.* Vol. 264, S. 919-932.

Rogers KR, Mulchandani A (1998), Affinity Biosensors, Techniques and Protocols, aus der Reihe : Methods in Biotechnology, 1. Auflage, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
Rybenkov VV, Volodgodskii AV, Cozzarelli NR (1997), The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling, , *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, S. 1412-1418.

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985), Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, Vol. 239, S. 1350-1354.

Saizieu de A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J (1998), Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays, *Nature Biotech.*, Vol. 16, S. 45-48.

Sauerbrey G (1959), Use of vibrating quartz for thin film weighing and microweighing, *Z. Phys.*, Vol. 155, S. 206-222.

Sawata S, Kai E, Ikeburo K, Iida T, Honda T, Karube I (1997), The existence of significant relation between secondary structure of DNA and sensitivity in signal detection, *Nucleic Acids Symp.-Ser*, Vol. 37, S. 247-248.

Scheller FW, Schubert F (1989), Biosensoren, Birkhäuser-Verlag, Basel, Schweiz.

Schlegel HG (1984), Allgemeine Mikrobiologie, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Shaiu WL, Larson DD, Vesenska J, Henderson E (1993), Atomic force microscopy of oriented linear DNA molecules labeled with 5 nm gold spheres, *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, 1, S.99-103.

Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM (1997), Steric factors influencing the hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, 6, S.1155-1161.

Shoffner M, Cheng J, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P, Chip PCR: I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR, *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, 1, S.375-379.

Simpson PC, Roach D, Wooley AT, Thorsen T, Johnston R, Sensabaugh GF, Mathies RA (1998), High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95 (5), S. 2256-2261.

Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussmann MR, Cerrina F (1999), Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nature Biotechn.*, Vol. 17, S. 974-978.

Southern EM (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, Vol. 98, S. 503-517.

Southern EM (1996), DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale, *TIG*, Vol. 12, S. 110-115.

Steel AB, Herne TM, Tarlov MJ (1998), Electrochemical quantification of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, Vol. 70 (22), S. 4670-4677.

Stenberg E, Persson B, Roos H Urbaniczky C (1991), *J. Coll. Interf. Sci.*, Vol. 143, S. 513-526.

Stiene M (1997), Elektrochemische Detektion von Virusinfektionen am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest, Dissertation, TU Braunschweig.

Strachan NJ, Gray DI (1995), A rapid general method for the identification of PCR products using a fibre-optic biosensor and its application to the detection of *Listeria*, *Lett. Appl. Microbiol.*, Vol 21 (1), S. 5-9.

Stryer L (1996), Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg.

Tanigawa M, Okada T (1998), Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 365, S. 19-25.

Tiefenthaler K (1992), Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors, in: Advances in Biosensors (Ed.: Turner APF), S. 261-289, Vol. 2, JAI Press, London.

Thorp HH (1998), Cutting out the middleman: DNA sensors based on electrochemical oxidation, *Trends Biotechnol.*, Vol. 16 (3), S. 117-121.

Treleaven JG, Gibson F, Ugelstad J, Renbaum A, Philip T (1985), Removal of neuroblastoma cells from bonemarrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres, *Lancet*, Vol. 14, S. 70-73.

Vandenberg ET, Bertilsson L, Liedberg B, Uvdal K, Erlandsson R, Elwing H, Lundström I (1991), Structure of 3-Aminopropyl Triethoxysilane on silicon oxide, *J. Coll. Interf. Sci.*, Vol. 147 (1), S. 103-118.

Vet JA, Majithia AR, Marras SA, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, Kramer FR (1999), Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, S. 6394-6399.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998), Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science*, Vol. 280 (5366), S. 1077-1082.

Wang J, Chicharro M, Rivas G, Cai X, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996), DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, Vol. 68, S. 2251-2254.

Wang J, Chen L, Chicharro (1996a), Trace measurements of nucleic acids using flow injection amperometry, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 319, S. 347-352.

Wang J, Cai X, Rivas G, Shiraishi H, Farias PAM, Dontha N (1996b), DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.*, Vol. 68, S. 2629-2634.

Wang J, Cai X, Rivas G, Shiraishi H, Dontha N (1997), Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips, *Biosens. Bioelectr.*, Vol. 12 (7), S. 587-599.

Waring MJ (1965), *J. Mol. Biol.*, Vol. 14, S. 269.

Wartell RM, Hosseini S, Powell S, Zhu J (1998) Detecting single base substitutions, mismatches and bugles in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods, *J. Chromatogr.*, Vol. 806, S. 169-185.

Watson JD, Crick FHC (1953a), A structure of desoxyribose nucleic acid, *Nature*, Vol. 171, S. 737-738

Watson JD, Crick FHC (1953b), Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid, *Nature*, Vol. 171, S. 962-967

Watts HJ, Yeung D, Parkes H (1995), Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor, *Anal. Chem.*, Vol. 67, S. 4283-4289.

Weetall HH (1976), Covalent coupling methods for inorganic support materials, in: *Methods of Enzymology*, (Ed.: Mosbach K), Vol. 44, Academic Press, New York.

Welsch W, Klein C, von Schickfus M, Hunklinger S (1996), Development of a surface acoustic wave immunosensor, *Anal. Chem.*, Vol. 68, S. 2000-2004.

Wetmur JG, Davidson N (1968), Kinetics of renaturation of DNA, *J. Mol. Biol.*, Vol. 31, S. 349.

Wetmur JG (1975), *Biopolymers*, Vol. 14, S.2517.

Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD (1998), A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, S. 2545-2553.

Wikström P, Mandenius CF, Larsson PO (1988), *J. Chromatogr.*, Vol. 455, S.105.

Wilchek M, Bayer EA (1990), *Meth. Enzymol.* Vol. 34, S. 463.

Williams RA, Blanch HW (1994), Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications, *Biosens. Bioelectr.*, Vol. 9 (2), S. 159-167.

Wood RW (1902), On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Phil. Mag.*, Vol. 4, S. 396-402.

Würzer M (1998), Mikrobiologische Analyseverfahren für Wasser, in: Analytiker Taschenbuch, Band 18, 1. Auflage, S. 3-43, Springer Verlag Berlin..

Yao S, Chen K, Zhu F, Shen D, Ne L (1994), Surface acoustic wave sensor system for the determination of total salt content in serum, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 287, S. 65-73.

Young BD, Anderson ML (1985), Quantitative analysis of solution hybridisation, in: *Nucleic acid Hybridisation, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Kapitel 3, S. 47-72.

Yu H, Ahmed H, Vasta GR (1998), Development of a magnetic microplate chemifluor-immunoassay for rapid detection of bacteria and toxin in blood, *Anal. Biochem.* , Vol. 261, S.1-7.

Zimmerman SB, Cohen GH, Davies DR (1975), X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid, *J. Mol. Biol.*, Vol. 92, S. 181-192.